



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL

**PLANTAS MEDICINAIS TROPICAIS E MEDITERRÂNICAS
COM PROPRIEDADES BIOCIDAS NO CONTROLO DE
INSETOS VETORES DE AGENTES PATOGÉNICOS**



DIARA KADY MONTEIRO VIEIRA LOPES ROCHA

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS, ESPECIALIDADE DE PARASITOLOGIA**

(JANEIRO, 2014)



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Plantas medicinais tropicais e mediterrânicas com propriedades biocidas no controlo de insetos vetores de agentes patogénicos

Autor: Diara Kady Monteiro Vieira Lopes Rocha

Orientadora: Professora Doutora Maria Teresa Lourenço Marques Novo (Prof. Auxiliar, Instituto de Higiene e Medicina Tropical /Universidade Nova Lisboa (IHMT/UNL); Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas (UPMM)/ Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT))

Coorientadoras:

Doutora Olívia Cruz de Matos (Investigadora Auxiliar, Instituto Nacional Recursos Biológicos /L- Instituto Nacional Investigação Agrária e Veterinária; UPMM/FCT)

Prof. Doutora Marilena Djata Cabral (Coordenadora, Departamento de Ciências Biológicas/Universidade de Cabo Verde)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor do Ramo de Ciências Biomédicas e Especialidade de Parasitologia)

Apoio financeiro da Fundação Calouste Gulbenkian, no âmbito do Programa “Doenças Tropicais Negligenciadas” para Licenciados dos PALOP’S.

Elementos bibliográficos resultantes da dissertação

Publicações relevantes

Rocha, D. K.; Matos, O.C.; Moiteiro, C.; Cabral, M.D. & Novo, M.T., 2013. Plantas Medicinais Tropicais e Mediterrânicas com Propriedades Biocidas para o Controlo de Insetos Vetores. *Anais do IHMT*, **12**: 60-65.

Rocha, D. K.; Matos, O.C.; Cabral, M.D. & Novo, M.T., 2013. Efeito de óleos essenciais de *Mentha pulegium* e *Foeniculum vulgare* sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). Colóquio Internacional Cabo Verde e Guiné Bissau, Lisboa. *Atas do Colóquio Internacional Cabo Verde e Guiné-Bissau: Percursos do Saber e da Ciência*. <http://coloquiocvgb.wordpress.com/actas/atas-comunicacoes/>

Rocha, D. K.; Matos, O.C.; Novo, M.T.; Delgado, M. Figueiredo, C. & Moiteiro, C. Chemical composition and larvicidal activity of leaf essential oils from *Mentha pulegium* and *Foeniculum vulgare*. Em fase de resubmissão.

Rocha, D. K.; Novo, M.T., Moiteiro, C. & Matos, O.C. Larvicidal property of *Mentha pulegium* essential oils against *Anopheles* sp. and *Aedes aegypti*, 1762, from Macaronesia Island. Em fase de resubmissão.

Publicações em congressos nacionais e internacionais

Rocha, D. K. Matos, O.C.; Moiteiro, C., Cabral, M.D. & Novo, M.T., 2013. Larvicidal properties of tropical and Mediterranean plants in the control of dengue and malaria vectors. Livro de resumos do Encontro Internacional das Doenças Tropicais Negligenciadas nos PALOP, realizado no dia 31 de outubro, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa (Comunicação Oral), 14 e 15.

Rocha, D. K. Matos, O.C.; Moiteiro, C.; Figueiredo C.; Delgado, M.; Amaro, A.; Liberato, M.C.; Cabral, M.D. e Novo, M.T., 2013. Bioatividade de plantas tropicais e mediterrânicas no controlo de *Aedes aegypti*. Poster apresentado no âmbito do Encontro Internacional das Doenças Tropicais Negligenciadas nos PALOP, realizado no dia 31 de outubro, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.

Rocha, D. K. Matos, O.C.; Moiteiro, C., Figueiredo C., Cabral, M.D. & Novo, M.T., 2013. Insecticidal activity of tropical and mediterranean plant product against *Aedes aegypti* larvae. The International Society for Neglected Tropical Diseases - ISNTD Bites 2013 Conference, Royal Geographical Society, 15 de outubro, Londres, (Poster).

Rocha, D. K.; Matos, O.C.; Cabral, M.D. & Novo, M.T., 2013. Plantas Medicinais Tropicais e Mediterrânicas com Propriedades Biocidas para o Controlo de Insetos Vetores de Agentes Patogénicos, 2º Congresso Nacional de Medicina Tropical, 22 e 23 de abril, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa, (Comunicação Oral).

Rocha, D. K., 2013. Potential of Tropical and Mediterranean plants against vector control of dengue and malaria. Workshop Bioplant, Plant Natural Products and Biotechnology, 25 a 27 de fevereiro, Department of Biology, FCUP IBMC - Instituto de Biologia Molecular e Celular, Porto, (Comunicação Oral).

Rocha, D. K.; Moiteiro, C.; Delgado, M., Novo, M.T., Matos, O.C., 2012. Biological activity of two essential oils and their constituents against *Aedes aegypti*. *Acta Parasitologica Portuguesa*, **19** (1/2), XVI Congresso Português de Parasitologia, 29-30 novembro, Lisboa: 112, 113 (Comunicação Oral).

Rocha, D. K., Matos, O.C., Novo, M.T., Delgado, M. & Moiteiro, C., 2012. Chemical compositions and larvicidal activity of essential oils from *Mentha pulegium* and *Foeniculum vulgare*. *Abstract Book 43rd International Symposium on Essential Oils*, 5-8 September, Lisbon (ISEO2012): 72 (Poster)
http://ihmtweb.ihmt.unl.pt/download/DiaraRocha/resumo_Simposio_EO.pdf

Rocha, D. K., Matos, O.C. Cabral, M.D. & Novo, M.T., 2012. Bioactivity of aromatic plants of Tropical and Mediterranean in insect vectors of pathogenic agents”. *Abstract book XV Congresso Ibérico de Entomologia*, 2-6 Setembro, Angra do Heroísmo, Açores:158. (Comunicação Oral).
http://ihmtweb.ihmt.unl.pt/download/DiaraRocha/Congresso_Ibericovf.pdf

Rocha, D. K.; Matos, O.C.; Cabral, M.D. & Novo, M.T., 2012. Plantas Medicinais Tropicais e Mediterrânicas com Propriedades Biocidas para o Controlo de Insetos Vetores de Agentes Patogénicos, III Jornadas Científicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical / UNL, 12 de dezembro, (Prémio da melhor Comunicação Oral).

Rocha, D. K.; Moiteiro, C.; Delgado, M., Novo, M.T., Matos, O.C., 2012. Biological activity of two essential oils and their constituents against *Aedes aegypti*. *Acta Parasitologica Portuguesa*, **19** (1/2): 112,113, XVI Congresso Português de Parasitologia, 29-30 de novembro, Lisboa, (Comunicação Oral).

Rocha, Diara K., 2011. Plantas medicinais tropicais com propriedades insecticidas (Tropical medicinal plants with insecticidal characteristics). I Colóquio Garcia de Orta. Plantas Medicinais. 12 de abril. IHMT, Lisboa, (Comunicação Oral).
http://ihmtweb.ihmt.unl.pt/download/DiaraRocha/Seminario_GarciadeOrta.pdf

Rocha, D., 2011. Substâncias naturais de origem vegetal com propriedades inseticidas. Jornadas sobre a Problemática da Investigação Científica na Uni-CV, Universidade Cabo Verde, Praia, fevereiro (Comunicação Oral).

*À minha filha Ana Margarida,
ao meu marido Jorge Rocha
e à minha mãe Ana Rylde*

Agradecimentos

Quero agradecer a Deus, pela constante força que me tem dado ao longo destes três anos e pela Sua imensa Graça nos ínfimos detalhes da vida.

Agradeço à Professora Doutora Maria Teresa Novo, por ter aceite ser minha Orientadora e pela revisão dos trabalhos, bem como pela amizade demonstrada.

À Co-orientadora Doutora Olívia Matos, os meus agradecimentos por tudo quanto me tem ensinado, desde o Mestrado e agora nos trabalhos realizados no âmbito da tese de Doutoramento. Agradeço, também, pelo rigoroso suporte científico, pela forma célere com que respondia a todos os meus “e-mails” e pela amizade que me dispensou ao longo destes anos.

À Professora Marilena Djata Cabral, agradeço a disponibilidade dispensada, mesmo estando geograficamente distante, em ser Co-orientadora deste trabalho.

À Professora Doutora Carla Sousa, agradeço a diligência com que aceitou integrar a minha Comissão tutorial.

À Fundação Calouste Gulbenkian, os meus agradecimentos pelo apoio financeiro concedido, sem o qual não teria sido possível realizar este projeto. Gostaria de agradecer à Doutora Hermínia Cabral e aos Drs. Laura Silva e João Saavedra, que sempre me informaram de todos os eventos científicos que seriam importantes para a concretização deste trabalho.

Agradeço à Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas/IHMT/UNL, pelo apoio logístico que serviu de suporte à realização deste trabalho.

À Doutora Cândida Liberato, agradeço a forma afável com que sempre me acolheu e pelas excelentes lições de botânica, tendo o seu contributo muito enriquecido os meus conhecimentos.

À Doutora Cristina Moiteiro e à Doutora Cristina Figueiredo da Faculdade de Ciências (FCUL), agradeço o constante apoio científico na caracterização química das plantas, todas as facilidades concedidas e os valiosos esclarecimentos.

À Doutora Ângela Barreto Moreno, pela sua total disponibilidade para discussão e esclarecimentos de dúvidas sobre a análise estatística dos dados. Obrigada “irmã” pelo incentivo à perseverança.

À Doutora Ana Amaro, agradeço pela sua colaboração na análise microscópica e nas fotografias, e pelas inúmeras sugestões. À minha colega e amiga Ana, dos tempos da Faculdade, o meu bem-haja.

Ao Professor Doutor Eduardo Mendes Ferrão e ao Professor Doutor António dos Santos Grácio, meus Orientadores científicos do Mestrado, obrigada pelo apoio e incentivo ao longo do meu percurso.

À Doutora Helena Ramos, à Professora Doutora Odete Afonso e ao Doutor Carlos Pires, os meus sinceros agradecimentos pelo incentivo ao longo dos anos e por todo o conhecimento científico que sempre me transmitiram.

Agradeço ao Professor Doutor Paulo Almeida, meu Orientador científico em vários projetos de investigação, pelo incentivo na busca do conhecimento.

A todos os meus colegas da Unidade de Parasitologia, obrigada pelo estímulo e amizade. Ao Mestre Gonçalo Seixas, agradeço pela cedência de bibliografia e ao Técnico Operacional Sr. José Ferreira, pela ajuda na manutenção das colónias de insetos e à Mestre e minha amiga Catarina Alves por toda a sua amizade e ajudas nos ensaios. Aos “Especialistas em Designer” Sr. Luís Marto e Sra Sílvia Duarte pelo apoio nos aspetos gráficos de preparação dos CDs.

Os meus agradecimentos às Instituições de Cabo Verde, nomeadamente UniCV, INIDA em Santiago e Ministério do Desenvolvimento Rural em Santo Antão, pelas informações e meios disponibilizados, fundamentais ao desenvolvimento das etapas iniciais deste projeto. Muito agradeço o apoio do Dr. Hailton Spencer, na captura dos mosquitos, e o Engenheiro Manuel Delgado, pelo apoio na colheita das plantas. Igualmente, à Eng. Carla Monteiro e à Sra. D. Conceição Fortes, pelo suporte no terreno. Ao Dr. Samuel Semedo e à Dra. Vera Cruz, obrigada pelas informações sobre a flora de Cabo Verde.

Agradeço, ao Doutor Hanano Yamada e ao Doutor Jeremie Gilles da “International Atomic Energy Agency Laboratories” pela cedência dos mosquitos.

Aos colegas do INIAV em Oeiras, obrigada por estes três anos de camaradagem e muito incentivo. Obrigada aos Técnicos Paula Vasilemko e Mário Santos pelas ajudas no laboratório.

Às tias Ângela e Fernanda, por terem gentilmente fornecido vasto material vegetal proveniente das suas propriedades.

À minha tia Ângela, muito obrigada pelos longos anos de dedicação.

Ao meu tio Santos Camacho e a minha avó Silvestra Monteiro, uma homenagem póstuma muito sentida. Sei que na Eternidade, hão-de estar radiantes ao verem toda a minha caminhada.

A todos os meus familiares que de perto ou de longe me apoiaram o meu bem-haja, mas um agradecimento muito em especial aos meus pais, que sempre me incentivaram nos grandes desafios. À minha mãe, um agradecimento muito e muito especial pela infinita paciência, por estar sempre por perto e por nunca ter deixado de acreditar em mim.

Um agradecimento especial ao meu marido Jorge, que sempre me acompanhou nos trabalhos de campo e por valorizar muito o meu esforço. À minha filha Ana Margarida agradeço pelo apoio gráfico, por toda a compreensão, paciência e carinho, amo-vos muito.

Resumo

As parasitoses e as arboviroses têm um impacto social e económico considerável, em particular nos países tropicais e subtropicais. Problemas financeiros e de gestão, assim como as alterações ambientais, a resistência dos vetores aos inseticidas e dos agentes patogénicos aos fármacos, o aumento e respetiva mobilidade da população humana contribuíram não só para o incremento da prevalência de doenças transmitidas por vetores, como também para a sua emergência ou reemergência em novas regiões.

O progressivo aumento de resistências nos insetos vetores tem levado à restrição progressiva da aplicação de inseticidas químicos e/ou à introdução de novos compostos sintéticos.

O presente estudo surgiu da necessidade de desenvolver novas medidas de controlo vetorial, mais seguras para o ambiente, e consistiu na avaliação das propriedades biocidas de plantas medicinais tropicais e mediterrânicas, (*Sambucus nigra*, *Melia azedarach*, *Azadirachta indica*, *Foeniculum vulgare* e *Mentha pulegium*), bem como na avaliação da sua utilidade no controlo dos culicídeos vetores de agentes patogénicos da malária e arboviroses, nomeadamente, *Anopheles arabiensis* e *Aedes aegypti*, em Cabo Verde.

Este trabalho englobou um conjunto de ações, nomeadamente a colheita, o processamento e o rastreio sobre alvos biológicos, de extratos vegetais e óleos essenciais (OE). Foram realizados extratos brutos de folhas de *S. nigra*, *M. azedarach* e *A. indica* com solventes de diferentes polaridades. Estes extratos foram posteriormente analisados por Cromatografia em Camada Fina e fracionados por Cromatografia em Coluna. Os OEs de *M. pulegium* e de *F. vulgare*, obtidos por hidrodestilação das partes aéreas ou por via comercial foram caracterizados qualitativamente e quantitativamente por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa e confirmada a identificação dos seus constituintes por Ressonância Magnética Nuclear.

Os bioensaios inseticidas foram efetuados de acordo com os testes padronizados da Organização Mundial de Saúde. Os resultados foram analisados estatisticamente com recurso aos programas Microsoft Excel ® 2010 e SPSS® para Windows e aos testes estatísticos considerados relevantes.

Quanto às três primeiras plantas referidas apenas o extrato de *S. nigra* revelou atividade em larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti*. Estas são também mais suscetíveis ao OE de *F. vulgare* (amostras de Cabo Verde e Portugal respetivamente $CL_{50} = 23,3$ e $28,2 \mu L^{-1}$) comparativamente ao óleo de *M. pulegium* (amostras de Cabo Verde e Portugal respetivamente $CL_{50} = 136,1$ e $107,3 \mu L^{-1}$). Embora não se tenham registado diferenças altamente significativas entre as plantas em estudo, é de salientar que as concentrações necessárias para eliminar 50, 90 e 99% da população são menores quando se aplica o OE de *F. vulgare*. Quanto ao *An. arabiensis* optou-se por avaliar apenas o OE de *F. vulgare*, não tendo sido observadas diferenças significativas comparativamente a *Ae. aegypti*. Os resultados de bioensaios com os compostos ativos de ambas as espécies vegetais evidenciaram a existência de efeitos sinérgicos. Os adultos demonstraram maior sensibilidade ao OE de *F. vulgare* de Cabo Verde. Este estudo permitiu uma caracterização química e avaliação de atividade de plantas de regiões geográficas que ainda não tinham sido estudadas com resultados bastante promissores.

Palavras Chave: *Aedes aegypti*, *Anopheles arabiensis*, controlo vetorial, plantas medicinais.

Abstract

Parasitoses and arboviroses have a considerable economic and social impact, particularly in tropical and subtropical countries. Financial and management problems, as well as environmental changes, vectors resistance to insecticides and of pathogens to drugs, the crescent density of human population and of their mobility, contributed not only to increase the prevalence of vector-borne diseases, but also to their reemergence or emergence in new regions. The progressive increase of insects' resistance to known insecticides has led to the progressive restriction of the application of chemical insecticides and/or the introduction of new synthetic compounds.

The present study arose from the need of developing new vector control measures, environmentally safe, and consists on the evaluation of biocidal properties of medicinal tropical and Mediterranean plants (*Sambucus nigra*, *Melia azedarach*, *Azadirachta indica*, *Foeniculum vulgare* and *Mentha pulegium*) and on their quantification, on mosquitoes vectors of pathogens causing malaria and arboviruses, namely *Aedes aegypti* and *Anopheles arabiensis* from Cape Verde.

A set of actions are included in this work, like the harvesting, processing and screening of plant extracts and essential oils (EO) on biological targets. Crude extracts from leaves of *S. nigra*, *M. azedarach* and *A. indica* were performed with solvents with different polarities. These extracts were subsequently analyzed by Thin Layer Chromatography and fractionated by Column Chromatography. The EOs of *M. pulegium* and *F. vulgare*, obtained by steam distillation of leaves and the aerial parts were characterized qualitatively and quantitatively by Gas Chromatography and Mass Spectrometry and confirmed by identification of its constituents by Nuclear Magnetic Resonance.

Insecticide bioassays were conducted according to standardized tests of the World Health Organization. The results were statistically analyzed using the program Microsoft Excel 2010 and SPSS ® for Windows ® and the statistical tests considered relevant.

From the first three plants mentioned only the *S. nigra* extracts showed activity against the 3rd stage larvae of *Ae. aegypti*. These larvae were also more susceptible to EO of *F. vulgare* (samples from Cape Verde and Portugal respectively $LC_{50} = 23.3$ and $28.2 \mu L^{-1}$) than those of *M. pulegium* (samples from Cape Verde and Portugal having $LC_{50} = 136.1$ and $107.3 \mu L^{-1}$, respectively). Although there were no significant differences between the plants studied, it was noted that concentrations required to eliminate 50, 90 and 99% of the larvae populations are lower when applying the EO of *F. vulgare*. For *Anopheles arabiensis* we choose to evaluate only the EO of *F. vulgare*, and no significant differences were observed between these results and those obtained against *Ae. aegypti*.

The results of the bioassay with the active compounds isolated from *M. pulegium* and *F. vulgare* evidenced the existence of synergistic effects. Adults showed greater sensitivity to OE *F. vulgare* from Cape Verde. This study allowed the chemical characterization and activity assessment of plants from two different geographic regions that were not studied before with highly promising results.

Keywords: *Aedes aegypti*, *Anopheles arabiensis*, vector control, medicinal plants.

Índice

Elementos bibliográficos resultantes da dissertação	ii
Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	viii
Índice.....	ix
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xii
Índice de Anexos	xiv
Lista de Abreviaturas	xv
I. Introdução	1
I.1. Nota Prévia	1
I.2. Malária em África	4
I.2.1. Vetores da região Afrotropical	5
I.2.2. Posição sistemática do género <i>Anopheles</i>	8
I.2.3. Ciclo de Vida do género <i>Anopheles</i>	8
I.3. Dengue	9
I.3.1. Vetores de Dengue	10
I.3.2. Posição sistemática do género <i>Aedes</i>	11
I.3.3. Ciclo de vida do género <i>Aedes</i>	12
I.4. Principais Métodos de controlo vectorial	14
I.4.1. Métodos Biológicos s.s.....	14
I.4.2. Métodos Ecológicos	16
I.4.3. Métodos Genéticos	17
I.4.4. Métodos Imunológicos	17
I.4.5. Métodos Químicos	18
I.4.6. Repelentes como medida de proteção individual	23
I.4.7. Bio inseticidas	26
I.4.8. Proteção Integrada	27
I.5. Modo de ação dos inseticidas	29
I.6. Mecanismos de resistência a inseticidas em mosquitos	31
I.7. Espécies vegetais em estudo e sua importância	35
I.7.1. <i>Sambucus nigra</i> L.	36
I.7.2. <i>Melia azedarach</i> L.	38
I.7.3. <i>Azadirachta indica</i> A. Juss	41
I.7.4. <i>Mentha pulegium</i> L.	43
I.7.5. <i>Foeniculum vulgare</i> Mill.....	46
I.8. Caracterização dos Óleos Essenciais (OEs) das plantas aromáticas e medicinais em estudo (<i>M. pulegium</i> e <i>F. vulgare</i>) e vias Biossintéticas.....	49
I.9. Acumulação de OE e sua localização em órgãos	52
II. Objetivos.....	54
III. Material e Métodos	57
III.1. Caracterização geográfica e edafoclimáticas do Arquipélago de Cabo Verde.....	58
III.2. Material vegetal.....	59
III.2.1. Colheita das plantas	59
III.2.2. Identificação das plantas e preparação de exemplares para herbário.....	60
III.3. Processamento do material vegetal.....	61
III.3.1. Obtenção de extratos vegetais.....	62
III.3.1.1 III. Secagem do material vegetal e produção de extratos.....	63

III.3.1.2 Filtração e evaporação.....	64
III.3.1.3. Análise cromatográfica dos extratos orgânicos.....	64
III.3.2. Obtenção de óleos essenciais de <i>Mentha pulegium</i> e <i>Foeniculum</i> <i>vulgare</i>	66
III. 3.2.1. Identificação dos constituintes majoritários dos OEs por Ressonância Magnética Nuclear (^1H e ^{13}C RMN).....	69
III.3.2.2. Análise qualitativa e quantitativa dos constituintes dos OEs.....	70
III.3.2.2.1. Cromatografia Gás-Líquido.....	70
III.3.2.2.2. Cromatografia Gás-Líquido-Espectrometria de Massa.....	71
III.4. Captura de mosquitos.....	71
III.4.1. Estabelecimento e manutenção das colônias do mosquito alvo.....	73
III.4.2. Otimização dos bioensaios.....	75
III.4.3. Bioensaios larvicidas	77
III.4.4. Bioensaios adulticidas	79
III.5. Análise microscópica	80
III.6. Análise estatística.....	80
IV. Resultados e Discussão.....	85
IV.1. Identificação do material vegetal.....	85
IV.2. Rendimento de secagem e extração do material vegetal.....	85
IV.3. Caracterização dos extratos de <i>Sambucus nigra</i> por Cromatografia em Camada Fina (CCF) e em Coluna (CC).....	87
IV.4. Caracterização dos óleos essenciais da <i>Mentha pulegium</i> e <i>Foeniculum vulgare</i> por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) e por Ressonância Magnética Nuclear de (^1H e ^{13}C RMN).....	89
IV.5. Bioensaios larvicidas com os extratos das Meliáceas.....	98
IV.6. Análise estatística dos bioensaios larvicidas e adulticidas.....	99
IV.7.1. Bioensaios larvicidas com os extratos do <i>Sambucus nigra</i> em acetato de etilo.....	105
IV.7.2. Bioensaios larvicidas com óleos essenciais da <i>M. pulegium</i> e <i>F. vulgare</i>	106
IV.7.3. Bioensaios larvicidas com os compostos ativos dos óleos essenciais da <i>M.</i> <i>pulegium</i> e <i>F. vulgare</i>	109
IV.7.4. Bioensaios adulticidas com óleo essencial de <i>F. vulgare</i>	111
IV.7.5. Tratamento estatístico dos bioensaios larvicidas e adulticidas.....	112
IV.7.5.1 Análise estatística da atividade larvicida.....	112
IV.8. Análise microscópica das larvas.....	121
V. Conclusões.....	124
VI. Referências Bibliográficas.....	131
Anexos.....	157

Índice de Figuras

Figura 1- Regiões e Países endêmicos da malária (1).....	4
Figura 2 - Distribuição mundial dos principais vetores, 2010 (2).....	6
Figura 3 - Exemplos de adultos (fêmea) de <i>An. arabiensis</i> , antes e depois de refeição sanguínea (3).....	7
Figura 4 - Áreas em risco de transmissão de dengue (regiões situadas entre as linhas negras). A laranja - países onde já ocorreram surtos de dengue (4).....	10
Figura 5 - Exemplar de um adulto fêmea de <i>Aedes aegypti</i>	12
Figura 6 - Ciclo biológico de <i>Ae. aegypti</i> . (5).....	13
Figura 7 - Representação esquemática dos principais mecanismos envolvidos na resistência às várias classes de inseticidas. Adaptado de Brogdon e McAllister, 1998. Legenda: Ache - acetilcolinesterase; <i>kdr</i> - “knock-down resistance”; IGRs - “Insect Growth Regulators”; DDT - Dicloro-Difenil-Tricloroetano.....	33
Figura 8 - <i>Sambucus nigra</i>	36
Figura 9 - <i>M. azedarach</i> em floração.....	38
Figura 10 - <i>Azadirachta indica</i>	41
Figura 11 - <i>Mentha pulegium</i>	43
Figura 12 - <i>Foeniculum vulgare</i>	46
Figura 13 - Mapa de Cabo Verde, adaptado (8).....	58
Figura 14 - As diferentes etapas da preparação do extrato.....	61
Figura 15 - Ilustração de sequência de uma cromatografia CCF. 1-linha de colocação da amostra; 2- amostra; 3- distância que a amostra deslocou-se ao longo da placa; 4- frente do solvente. (11).....	65
Figura 16 - Sistema Clevenger adaptado.....	67
Figura 17 - Biótopos de <i>Ae. aegypti</i> junto às habitações na região de Santiago Norte e biótopos de <i>An. arabiensis</i> , junto à Barragem de Poilão na ilha de Santiago, em Cabo Verde.....	72
Figura 18 - Esquema geral do bioensaio larvicida.....	78
Figura 19 - Imagens do ensaio adulticida.....	79
Figura 20 - Estrutura química dos principais compostos que constituem os OEs da <i>M. pulegium</i> e <i>F. vulgare</i>	97
Figura 21 - Curva dose-mortalidade de plantas de Portugal (a) e de Cabo verde (b).....	102
Figura 22 - Curva dose-mortalidade observada e estimada. Plantas de Portugal (a) e de Cabo Verde (b).....	103
Figura 23. Os valores de R^2 obtidos da regressão entre as concentrações observadas e estimadas. Portugal (a) e Cabo verde (b). a1- <i>F.vulgare</i> ; a2 - <i>S. nigra</i> (ambos em <i>Ae. aegypti</i> /L ₃); a3 - <i>F. vulgare</i> em <i>An. arabiensis</i> /L ₃ ; b1 - <i>F.vulgare</i> ; b2 - <i>M. pulegium</i> ; b3 - pulegona e <i>t</i> -anetol (os últimos em <i>Ae. aegypti</i> /L ₃	104
Figura 24 - Comparação da atividade larvicida dos OE's de <i>F. vulgare</i> Cabo verde (CV) e de Portugal (Port) em larvas de <i>An. arabiensis</i> e de <i>Ae. aegypti</i>	108
Figura 25 - Comparação da atividade larvicida dos OEs de <i>F. vulgare</i> e da <i>M. pulegium</i> de Cabo Verde (CV) e de Portugal (P) e dos respetivos compostos ativos nas larvas do 3º estágio de <i>Ae. aegypti</i>	110
Figura 26 - Aspetos morfológicos das larvas de <i>Ae. aegypti</i> observadas ao estereomicroscópio (A); 1mm e ao microscópio óptico (B), 200 µm; cont=controlo; lim = limoneno	123

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Modos de ação dos 100 inseticidas/acaricidas mais vendidos.....	30
Tabela 2 - Propriedades biocidas apresentadas por diferentes partes de <i>M. azedarach</i>	40
Tabela 3 - Metabolitos presentes em <i>Melia azedarach</i> com atividade biológica descrita.....	41
Tabela 4 - Propriedades medicinais e atividades biológicas apresentadas por diferentes partes de <i>A. indica</i>	43
Tabela 5- Propriedades medicinais e atividade biológica de <i>M. pulegium</i>	46
Tabela 6 - Propriedades biocidas apresentadas por diferentes partes de <i>F. vulgare</i>	49
Tabela 7 - Rotina semanal de atividades desenvolvidas para manutenção da colónia de <i>Ae. aegypti</i>	75
Tabela 8 - Rendimento de secagem das plantas em estudo.....	85
Tabela 9 - Peso dos extratos e Rendimento de extração.....	86
Tabela 10 - Fator de retenção das manchas observadas na TLC em <i>S. nigra</i> (EtOH).....	88
Tabela 11 - Composição por GC dos óleos essenciais de <i>M. pulegium</i> de Cabo Verde e Portugal.....	91
Tabela 12 - Composição por GC dos óleos essenciais isolado do <i>F. vulgare</i>	93
Tabela 13 - Identificação dos constituintes maioritários da análise de RMN de ¹³ C do OE de <i>Mentha pulegium</i> de Portugal (Equipamento de RMN 400 MHz).....	97
Tabela 14- Identificação dos compostos maioritários da análise por RMN de ¹³ C do OE do <i>F. vulgare</i> de Cabo Verde (Equipamento de RMN de 400 MHz).....	98
Tabela 15 - Testes de Pearson e Verossimilhança do Qui-Quadrado aplicados aos dados e os respetivos parâmetros estatísticos, [Qui-Quadrado (χ^2), graus de liberdade (df), sigma (p) e alfa (α)].....	101
Tabela 16 - Atividade do extrato em acetato de etilo (EtOAc) de <i>S. nigra</i> no 3º estágio das larvas de <i>Ae. aegypti</i> , 24 horas após o contacto.....	105
Tabela 17 - Efeito larvicida dos óleos essenciais de <i>F. vulgare</i> e <i>M. pulegium</i> em larvas do 3º estágio de <i>Ae. aegypti</i> , 24 horas após contacto.....	107
Tabela 18 - Atividade larvicida do OE de <i>F. vulgare</i> de Cabo Verde e Portugal em <i>An. arabiensis</i> , 24 horas após a exposição.....	109
Tabela 19 - Atividade larvicida dos compostos ativos do <i>F. vulgare</i> (a) e da <i>M. pulegium</i> (b).....	111
Tabela 20 - Atividade do OE de <i>F. vulgare</i> em mosquitos adultos de <i>Ae. aegypti</i> , (a) e em <i>An. arabiensis</i> (b).....	112
Tabela 21 - Análise estatística da atividade larvicida face às doses aplicadas dos OEs das espécies vegetais em estudo. Testes de Normalidade.....	113
Tabela 22 - Análise estatística da atividade larvicida face às concentrações aplicadas dos OEs das espécies vegetais em estudo.....	115
Tabela 23 - Análise estatística da atividade larvicida face às doses aplicadas dos OEs das espécies vegetais em estudo.....	116
Tabela 24 - Análise estatística da atividade larvicida e adulticida face às doses aplicadas, dos OEs das espécies vegetais e os respetivos compostos. Estatística descritiva e testes de Normalidade.....	117

Tabela 25 - Análise estatística da atividade larvicida e aduítica face às doses aplicadas, das espécies vegetais e os respectivos compostos. Testes paramétricos e não paramétricos.....	117
Tabela 26 - Coeficiente de regressão de Pearson e nível de significância (α) (2-tailed), entre as mortalidades em função das diferentes concentrações de compostos ativos e extratos vegetais estudados.....	120

Índice de anexos

Anexo I - Cromatografias.....	157
Anexo II - Protocolos dos testes de sensibilidade.....	159
Anexo III - Análise da Cromatografia TLC e CC do extrato <i>S. nigra</i> (EtOH e EtOAc).....	163
Anexo IV - Espectros do GC-MS dos óleos essenciais.....	166
Anexo V - Espectros de ^1H ^{13}C de NMR dos óleos essenciais.....	169
Anexo VI - Bioensaios larvicidas com os extratos das meliáceas.....	172
Anexo VII - Bioensaios larvicidas com os extratos de <i>S. nigra</i> em acetato de etilo e com óleos essenciais de <i>M. pulegium</i> e <i>F. vulgare</i>	174

Lista de abreviaturas

A - *Azadirachta*

Ae - *Aedes*

An - *Anopheles*

α - Nível de Significância

CA - Compostos ativos

CC - Cromatografia em Coluna

CI - Intervalo de confiança

CL_(50, 90 e 99) - Concentração letal que mata 50, 90 e 99% da população, respetivamente

CV - Cabo Verde

DDT - Dicloro difenil tricloroetano

EtOAc- Acetato de etilo

EtOH - Etanol

Fv - *Foeniculum*

g - grama

GC-MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espetrometria de Massa

GST - Glutatio S transferase e monoxigenase

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Resolução

IGR - “Insect Growth Regulator”, Reguladores de Crescimento de Insetos

IHMT - Instituto de Higiene e Medicina Tropical

IICT - Instituto de Investigação Científico Tropical

INRB /INIAV - Instituto Nacional de Recursos Biológicos e Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

IRS - “Indor residual spraying”, aplicação de inseticidas residuais no interior

Kdr - “Knock-down resistance”, resistência por silenciamento de genes

K-S - Kolmogorov-Smirnov's

Ku. - “Kurtosis”, Curtose

M - *Melia*

M - *Mentha*

Mbar - milibar

Md - Mediana

mg L⁻¹ - Miligrama por litro

N - Número de observações

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

OE - Óleo essencial

OMS - Organização Mundial de Saúde

Port - Portugal

Rf - Índice de retenção

RI - Índice de retenção relativa

s - Desvio padrão

Sk. - “Skewness”, Assimetria

S-W - Shapiro-Wilk

TLC - Cromatografia em Camada Fina

UniCV - Universidade de Cabo Verde

X - Média

µl L⁻¹ - Microlitro por litro

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

I.1. Nota Prévia

Os mosquitos (Diptera: Culicidae) são o grupo mais importante de artrópodes com importância médica e veterinária, sendo responsável pela transmissão de doenças consideradas graves problemas de saúde pública a nível mundial.

As parasitoses e as arboviroses têm um impacto social e económico considerável, em particular nos países tropicais e subtropicais, o que levou a Organização Mundial de Saúde a declarar os mosquitos como “inimigo público número um”. Com o desenvolvimento do comércio e meios de transporte, assistiu-se à dispersão de insetos vetores para várias regiões do globo, com a agravante destes se terem adaptado com sucesso a meios urbanos.

Problemas financeiros e de gestão, assim como alterações ambientais, desenvolvimento de resistência dos vetores aos inseticidas e dos agentes patogénicos aos fármacos, aumento da densidade populacional humana e acréscimo da sua mobilidade, contribuíram não só para o incremento da prevalência de doenças transmitidas por vetores, como também para a sua emergência ou reemergência em novas regiões (casos da malária na Grécia e de dengue em Cabo Verde e na ilha da Madeira).

Dado que ainda não existem vacinas e/ou tratamentos eficazes para a maior parte das patologias envolvendo transmissão por mosquitos, os programas de controlo vetorial constituem uma das principais estratégias de prevenção e combate. Os produtos químicos continuam a ser o elemento chave numa abordagem integrada deste controlo de vetores. No entanto, o arsenal de inseticidas seguros e eficazes tem vindo a reduzir-se devido, quer ao aumento das resistências causado pela utilização intensiva e/ou incorreta de inseticidas sintéticos (consequência da insustentabilidade económica dos atuais programas de controlo), quer aos efeitos adversos ambientais e em saúde pública.

O progressivo aumento de resistências dos insetos vetores de parasitoses e arboviroses tem levado à restrição progressiva da aplicação de inseticidas químicos e/ou à introdução de novos compostos sintéticos. Consequentemente, devido à redução do número de compostos disponíveis no mercado, assiste-se a um aumento da procura de

compostos de origem natural, eficazes e mais inócuos para o ambiente. Esta exigência do mercado, em conjunto com as pressões legislativas exercidas a nível internacional, torna imperativo o investimento na pesquisa de novos produtos, promovendo o desenvolvimento de produtos alternativos mais seguros.

Os produtos de origem vegetal ressurgem, assim, como uma promissora fonte de compostos biologicamente ativos para controlo de vetores de agentes patogénicos. Dado que a sua síntese está muitas vezes associada a mecanismos de defesa das plantas contra inimigos naturais, os compostos derivados destas apresentam potencialmente maior especificidade para os organismos-alvo, são em geral biodegradáveis e comportam menores riscos ambientais.

Um vasto número de diferentes espécies de plantas, de várias regiões geográficas, tem revelado potencialidades fitoquímicas, capazes de causar efeitos tóxicos agudos ou crónicos em insetos.

O presente estudo surgiu da necessidade de desenvolver novos produtos para uso em controlo vetorial, mais seguros para o ambiente, e consistiu na avaliação das propriedades biocidas de produtos de plantas medicinais tropicais e mediterrânicas (*Sambucus nigra*, *Melia azedarach*, *Azadirachta indica*, *Mentha pulegium* e *Foeniculum vulgare*) em culicídeos vetores de agentes patogénicos de malária e arboviroses, nomeadamente, *Anopheles arabiensis* e *Aedes aegypti*, em Cabo Verde. A inovação desta tese é a pesquisa de novos compostos provenientes de plantas, preferencialmente autóctones, que contribuam para a preparação de futuras formulações bio-inseticidas de fácil produção, máxima inocuidade ambiental e que não promovam o desenvolvimento de resistências.

Neste capítulo introdutório apresenta-se uma descrição geral da importância dos vetores de malária e arboviroses no continente africano, com breve referência a outras doenças por eles transmitidas. Particular ênfase é dada às medidas de controlo vetorial, modo de ação e mecanismos de resistência aos inseticidas, caracterização botânica das espécies vegetais em estudo, breve descrição das vias de biossíntese dos constituintes dos óleos

essenciais e órgãos de produção. O capítulo 2 apresenta os objetivos gerais e específicos propostos no âmbito do tema da tese. No capítulo 3 são descritas as metodologias utilizadas no estudo experimental, cujos resultados são apresentados e discutidos no capítulo 4, comparados com os referidos na literatura, quando possível. No capítulo 5 são apresentadas as principais conclusões e as perspectivas futuras, estando as referências bibliográficas listadas no capítulo 6. Este último capítulo foi escrito segundo a norma NP-405, integrando as citações correspondentes a endereços electrónicos consultados, que são referidas em numeração árabe ao longo do texto.

I.2. Malária em África

A malária é uma doença parasitária que tem como agentes etiológicos protozoários do género *Plasmodium*, sendo endémica em 104 países. Destes, 79 são classificados como estando na fase de malária controlada, 10 na fase de pré-eliminação, 10 na fase de eliminação e 5 sem transmissão, isto é na fase preventiva de reintrodução (WHO, 2012).

A malária, sendo uma das mais antigas doenças infecciosas conhecidas nas sociedades africanas, continua a causar morbilidade e mortalidade elevadas, com consequente sobrecarga socioeconómica nas regiões particularmente mais afetadas. De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO), em 2010 foram notificados cerca de 216 milhões de caso de malária a nível mundial (WHO, 2012). Mais de 80% dos casos e 91% das mortes foram registadas no continente africano, tendo um custo anual superior a 12 mil milhões de dólares e causando um atraso no crescimento económico de cerca de 1,3 por cento por ano (TDR/WHO, 2002; RBM/WHO, 2000; GHO, 2008; Malaria Foundation Internacional, 2008). Assim, a malária continua a ser um dos maiores problemas de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais (Figura 1).

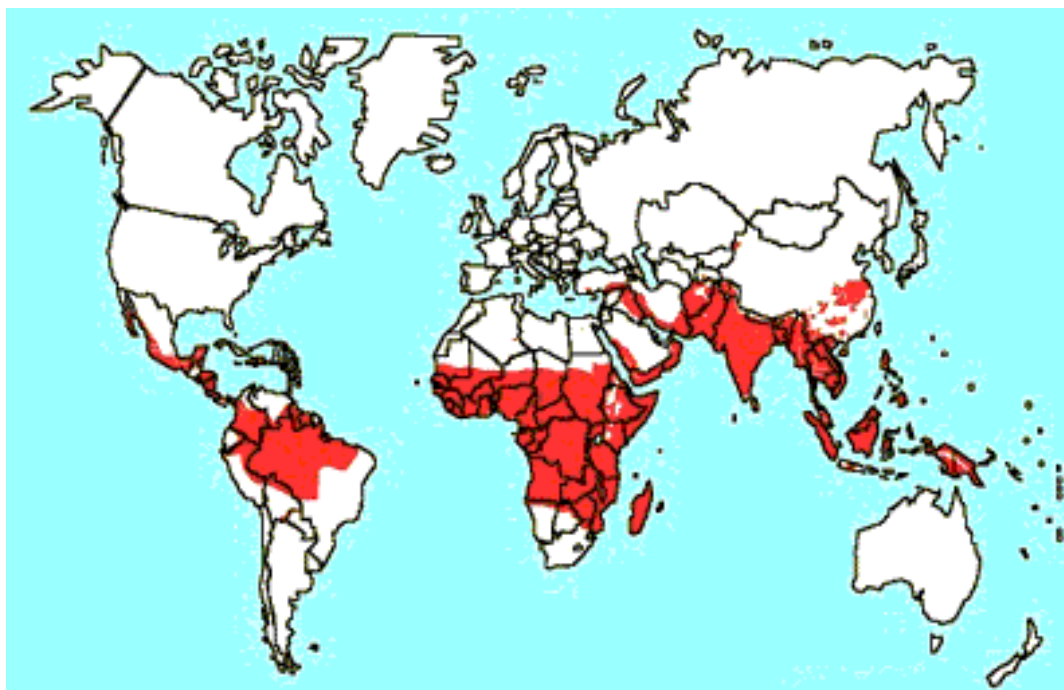


Figura 1- Regiões e Países endêmicos da malária (1).

Atualmente, o continente africano enfrenta grandes desafios, sendo um deles o combate à endemicidade da malária em cerca de 46 países, conjuntamente com problemas inerentes ao subdesenvolvimento e outras prioridades consideradas relevantes para as autoridades locais, (Sachs & Malaney, 2002).

Em Cabo Verde, a malária foi quase erradicada após o programa de controlo desenvolvido entre 1940 e 1970. Desde 1973 que casos autóctones são apenas observados na Ilha de Santiago, onde reside aproximadamente metade da população. Surtos epidémicos ocorrem de forma irregular e a população é considerada não-imune (Alves, 1994).

I.2.1. Vetores da região Afrotropical

A malária é transmitida entre humanos pela picada de mosquitos fêmeas do género *Anopheles*. Os principais vetores de malária na região Afrotropical pertencem ao complexo de espécies *Anopheles gambiae*. Este complexo compreende 7 espécies gémeas: *Anopheles gambiae sensu stricto* (s.s.) Giles, 1902; *Anopheles arabiensis* Patton, 1905; *Anopheles quadriannulatus* Theobald, 1911; *Anopheles melas*, Theobald, 1903, *Anopheles merus* Dönitz, 1902; *Anopheles bwambae* White, 1985 e *Anopheles quadriannulatus* espécie B (Hunt et al., 1998). Apesar de serem morfologicamente semelhantes, estas espécies apresentam diferenças bioecológicas e comportamentais que condicionam o modo como transmitem a doença (White, 1974; Besansky et al., 1994, Coluzzi, 1994; Hunt et al., 1998; Coetzee et al., 2000; della Torre et al., 2002). Deste complexo, os mais eficientes vetores de malária e também com mais vasta distribuição geográfica, são *Anopheles gambiae* s.s. Giles, 1902 e *Anopheles arabiensis* Patton, 1905 (White, 1974, Coetzee et al., 2000). A distribuição geográfica destas espécies é crucial para a epidemiologia da malária e definição de medidas de controlo da doença numa dada região (Figura 2).

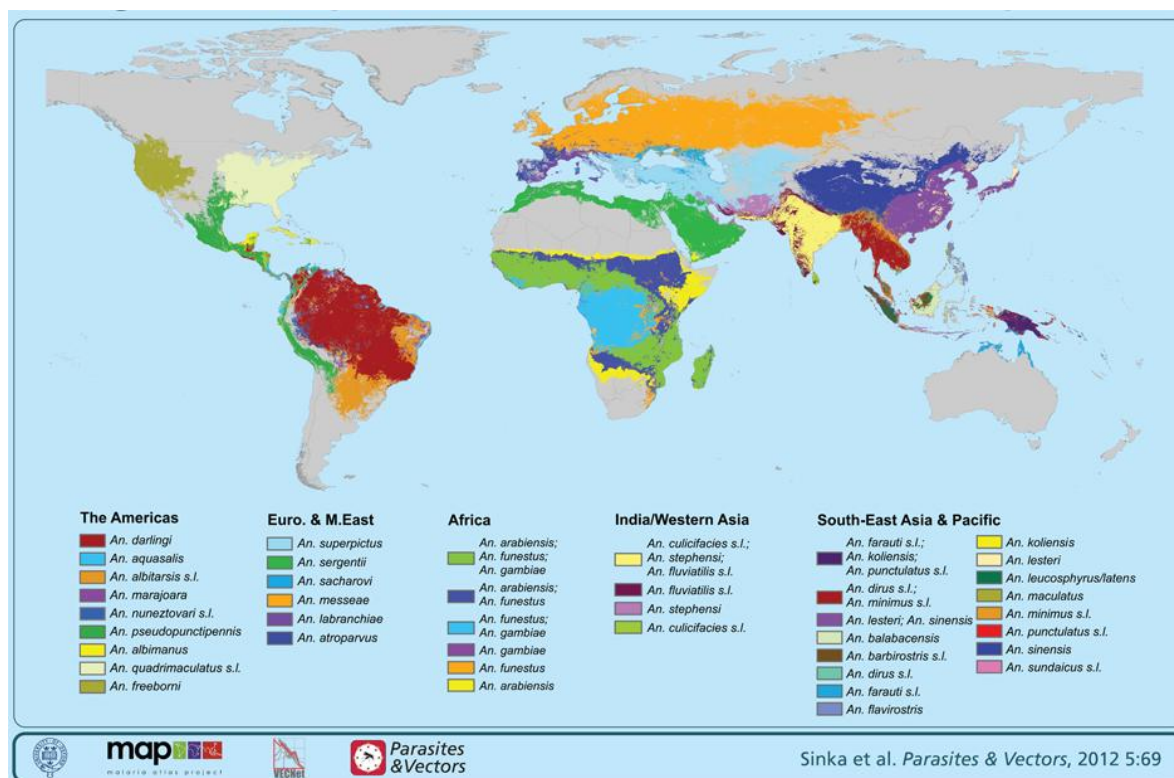


Figura 2 - Distribuição mundial dos principais vetores da malária, 2010 (2).

De acordo com Davidson *et al.*, 1967, *An. gambiae s.s.* predomina nas regiões de floresta mais húmidas, enquanto *An. arabiensis*, como o próprio nome sugere, está mais frequentemente associado a regiões áridas e zonas de savana seca, onde a estação das chuvas é curta e as precipitações são relativamente baixas. Estas espécies estão mais associadas ao ser humano e apresentam maior distribuição geográfica, ocorrendo em simpatria em extensas áreas da sua distribuição. As espécies *An. merus* e *An. melas* estão adaptadas a biótopos de água salobra. *An. melas* é um importante vetor da malária em várias localidades ao longo da costa Oeste Africana, principalmente na época seca, quando a população de *An. gambiae s.s.* é menos abundante. A espécie *An. merus* encontra-se em zonas costeiras da África Oriental e é considerado um vetor secundário da doença (Gillies & de Meillon, 1968; Cuamba & Mendis, 2009).

An. arabiensis apresenta um índice de antropofilia variável, utilizando também como hospedeiros outros animais (nomeadamente gado), variando a sua preferência trófica em função dos hospedeiros presentes nas imediações dos biótopos larvares. Tem uma longevidade curta e pica tanto no interior como no exterior das habitações (endo e

exofágico) o que dificulta o seu controlo pela aplicação de inseticidas dirigida à população de fêmeas em atividade (Fontenille *et al.*, 1997).

O primeiro culicídeo assinalado em Cabo Verde (Praia, Santiago) terá sido *An. gambiae* s.l. por A. Vieira, em 1909, designado de *An. costalis*. [*fide* Sant'Anna, 1920; Ribeiro *et al.*, 1980]. *An. arabiensis*, única espécie vetora de malária presente no arquipélago (Alves, 1994), conjuntamente com *An. pretoriensis* (Theobald, 1903) terão praticamente desaparecido em 1969 em todas as ilhas, excepto Santiago, na sequência de esforços desenvolvidos no âmbito de um programa de erradicação. A espécie foi posteriormente encontrada na maioria das ilhas, excepto Brava, Sal e Santo Antão. A malária não constitui um problema prioritário de Saúde Pública em Cabo Verde mas, dada a vulnerabilidade e a recetividade do país, é necessária uma vigilância epidemiológica permanente orientada para a prevenção, deteção precoce e contenção de epidemias, tratamento correto dos casos e monitorização da eficácia do tratamento, bem como vigilância e controlo entomológicos (Alves, 1994; Alves *et al.*, 2010; Ministério da Saúde, 2009).

An. arabiensis (Figura 3) foi descrito em Cabo Verde como um mosquito antropofílico, de tendência exofágica e exofílica, com uma área de distribuição entre a costa e 500 metros de altitude (Cambournac, 1982). As larvas desta espécie encontram-se presentes, ao longo do ano, em tanques e poços agrícolas, levadas, tanques domésticos mal cobertos, poças temporárias e charcos, constituindo os primeiros biótopos larvares permanentes. No entanto, tem como locais de criação mais produtivos as poças nas margens das ribeiras, pegadas de animais e charcos temporários expostos ao sol formados durante a época das chuvas pelo que, durante este período, há tendência para uma proliferação significativa do vetor, que é também facilitada pelo aumento da temperatura.



Figura 3 - Exemplares de adultos (fêmea) de *An. arabiensis*, antes (foto da autora) e depois de refeição sanguínea (3).

I.2.2. Posição sistemática do género *Anopheles*

Os mosquitos do género *Anopheles* pertencem à Família Culicidae, uma das mais importantes da Ordem Diptera.

De acordo com a classificação sistemática de Richard & Davis (1977) a posição sistemática do género *Anopheles* é a seguinte:

Reino - Animalia

Filo - Arthropoda

Classe - Insecta

Subclasse - Pterigota

Ordem - Diptera

Subordem - Nematocera

Família - Culicidae

Subfamília - Anophelinae

Género - *Anopheles*

A subfamília Anophelinae inclui três géneros (*Anopheles*, *Bironella* e *Chagasia*), sendo o género *Anopheles* o único com importância médica, por a ele pertencerem espécies vectoras de *Plasmodium* spp, várias arboviroses e filarioses (Service, 1980; Ruppert & Barnes, 1996) que afetam humanos. Existem aproximadamente 430 espécies conhecidas de *Anopheles*, das quais cerca de 70 são vetores de malária (Warrell & Gilles, 2002).

I.2.3. Ciclo de vida de *Anopheles*

Durante o seu ciclo de vida, o mosquito passa por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. Como todos os mosquitos, *Anopheles* apresenta uma fase imatura aquática e uma fase adulta aérea. O ciclo inicia-se com a oviposição, durante a qual a fêmea deposita os seus ovos individualmente (em média 50-300 ovos) à superfície da água, em biótopos ou criadouros larvares que variam de espécie para espécie. Os mais comuns incluem coleções de água naturais tais como margem de rios, lagos, lagoas, poças temporárias e pântanos; ou artificiais como tanques e canais de irrigação. No entanto,

diferentes espécies de mosquitos tendem a fazer a postura em biótopos com propriedades físicas e químicas muito específicas (Mullen & Durden, 2009). Os ovos, em forma de canoa, apresentam flutuadores laterais que impedem a submersão e, frequentemente, apresentam um padrão ornamental característico da espécie.

Destes ovos eclodem larvas de primeiro estágio, que sofrem três mudas até atingirem o quarto estágio de desenvolvimento, e que se alimentam por filtração de partículas em suspensão na água (bactérias, protozoários, outros microrganismos e detritos orgânicos). A larva em último estágio sofre uma metamorfose transformando-se em pupa. Nesta fase quiescente, os culicídeos não se alimentam mas movimentam-se, geralmente, em resposta a estímulos, passando a maior parte do tempo à superfície da água para respirar e têm forma característica, em vírgula. Nos trópicos esta fase dura dois a três dias, enquanto em regiões temperadas pode durar nove a doze dias. Ocorrem alterações profundas dos tecidos (metamorfose) que culminam na emergência do adulto, iniciando-se assim a fase terrestre do ciclo de vida. Após a emergência, os adultos procuram abrigos perto do biótopo para repousar. Na maior parte dos casos, a cópula ocorre 24-48 horas após a emergência, geralmente em enxames de machos formados ao anoitecer. Em geral, as fêmeas acasalam uma única vez, acumulando o esperma numa estrutura designada por espermateca. Após a cópula, as fêmeas procuram um hospedeiro vertebrado para efetuar uma refeição sanguínea, necessária à maturação ovárica que, uma vez concluída, leva a fêmea a procurar um local aquático adequado para realizar a oviposição. (Faust *et al*, 1975). O período compreendido entre a procura de hospedeiro para realizar a refeição sanguínea e a maturação dos ovos é designado de ciclo gonotrófico e pode durar dois a cinco dias. Os machos não são hematófagos, alimentando-se de sucos vegetais.

I.3. Dengue

A dengue é uma doença infecciosa febril aguda causada por um vírus da família Flaviviridae, género *Flavivirus*, que inclui quatro tipos imunológicos DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, e tem como principais vetores duas espécies de

mosquito, nomeadamente, *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus*, (Skuse, 1894), (Gubler & Kuno, 1997; Borges, 2001).

Esta infeção é uma das mais importantes doenças reemergentes nos trópicos (Gubler & Kuno, 1997), sendo responsável por cerca de 100 milhões de casos/ano numa população em risco de 2,5 a 3 biliões de pessoas (WHO, 1997; Roriz-Cruz *et al.*, 2010), constituindo um grave problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais (Figura 4). A febre hemorrágica da dengue (FHD) e a síndrome de choque da dengue (SCD) atingem pelo menos 500 mil pessoas/ano, apresentando taxas de mortalidade de até 10% para pacientes hospitalizados e 30% para pacientes não tratados (Holmes *et al.*, 1998; Gubler, 1998, Sylla *et al.*, 2009). A dengue é endémica no sudeste asiático e tem originado epidemias em várias regiões tropicais, em intervalos de 10 a 40 anos (Gubler & Clark, 1995).

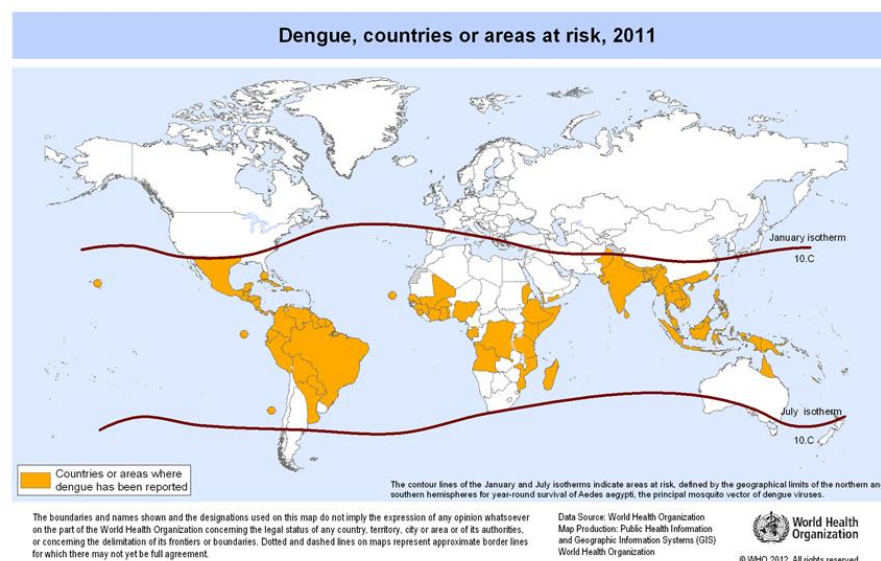


Figura 4 - Áreas em risco de transmissão de dengue (regiões situadas entre as linhas negras). A laranja - países onde já ocorreram surtos de dengue (4).

I.3.1. Vetores de dengue

O vírus de dengue é transmitido por mosquitos que pertencem ao género *Aedes*, nomeadamente *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

Embora originário da região Afro-tropical *Ae. aegypti* apresenta, atualmente, uma distribuição cosmotropical. Esta expansão está associada à capacidade dos seus ovos suportarem longos períodos de dessecação, podendo assim ser inadvertidamente transportados devido a atividades humanas. A dispersão e estabelecimento de populações destes mosquitos tem sido favorecida, assim, através da disponibilidade de criadouros larvares (baldes, pneus, contentores artificiais), através de transporte marítimo ou aéreo de ovos/ adultos para outros lugares do mundo e através do aumento da urbanização em precárias condições sanitárias, gerando situações ideais para a criação desta espécie (Jansen & Beebe, 2010; Williams *et al.*, 2010).

I.3.2. Posição sistemática do género *Aedes*

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linneaus, 1762) pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera e família Culicidae. Esta família inclui cerca de 3500 espécies e subespécies distribuídas por todos os continentes, excepto na Antártica e em algumas ilhas, podendo ser encontradas abaixo do nível do mar até altitudes superiores a 3000 metros (Marquardt, 2010). A família dos culicídeos subdivide-se em três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae. Os géneros *Anopheles*, *Culex* e *Aedes* são aqueles que apresentam maior número de espécies e subespécies com relevância para a saúde humana.

De acordo com a classificação sistemática de Richard & Davis (1977) a posição sistemática do género *Aedes* é a seguinte:

Reino Animalia

Filo Arthropoda

Classe Insecta

Ordem Diptera

Família Culicidae

Subfamília Culicinae

Género *Aedes*

Ae. aegypti é considerado o principal vetor de três importantes arboviroses - dengue (vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, DENV), febre-amarela (vírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, YFV) e chikungunya (vírus da família *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, CHIKV), sendo também um importante agente de incomodidade provocando reações alérgicas no ato da picada.

Ae. aegypti é um mosquito de cor escura de fácil identificação, visto que apresenta no seu tórax, nomeadamente no escudo, escamas brancas dispostas em linhas laterais longitudinais formando um desenho que lembra uma lira (Figura 5).



Figura 5 - Exemplar de um adulto fêmea de *Aedes aegypti* (fotografia da autora).

I.3.3. Ciclo de vida do gênero *Aedes*

Ae. aegypti, tal como todas as espécies de culicídeos, apresenta uma fase imatura aquática e uma fase adulta aérea/terrestre (Figura 6). O ciclo inicia-se com a oviposição, durante a qual a fêmea deposita os seus ovos individualmente em águas limpas e paradas, preferencialmente em biótopos de reduzidas dimensões, frequentemente com origem na atividade humana. Nestes incluem-se, frequentemente, pneus, vasos de plantas, baldes ou qualquer recipiente que se encontre dentro ou na periferia de habitações. Os ovos são colocados à superfície da água ou perto dela, demorando as larvas dois a três dias a eclodir (Wong *et al.*, 2011). Estes ovos têm a característica peculiar de resistirem à dessecação durante longos períodos de tempo e eclodirem quando submergidos em água. Dos ovos eclodem as larvas que passam, através de mudas, por quatro estádios de desenvolvimento designados por L1, L2, L3 e L4. As

larvas alimentam-se da matéria orgânica presente no seu biótopo. A larva em último estágio sofre uma metamorfose transformando-se em pupa. O período larvar pode durar, em média, sete a nove dias à temperatura média de 25°C. O mosquito permanece na fase de pupa cerca de dois dias. Nesta fase, considerada de quiescente, os culicídeos não se alimentam mas movimentam-se, geralmente, em resposta a estímulos. Das pupas emergem os mosquitos adultos, que vão copular e alimentar-se de néctares açucarados (machos e fêmeas) e, no caso das fêmeas, de refeições sanguíneas.

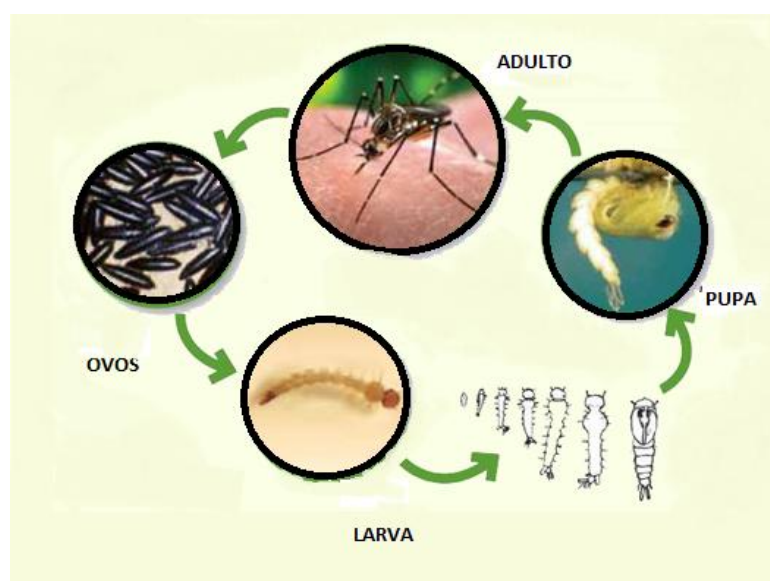


Figura 6 - Ciclo biológico de *Ae. aegypti* (5).

Ae. aegypti caracteriza-se por ser uma espécie com hábitos sinantrópicos (vivem na proximidade, ou interior, de habitações humanas), tende a repousar no interior de habitações/instalações animais pelo que se designa de endofílica e tem preferência por se alimentar em humanos ou seja, apresenta elevada antropofilia (Jansen *et al.*, 2010). Normalmente apresentam atividade de picada diurna, podendo alimentar-se, fora ou dentro das habitações, em um ou em vários hospedeiros durante o mesmo ciclo gonotrófico (Jansen e Beebe, 2010). Após a refeição, as fêmeas preferem locais abrigados e escuros para o repouso. A atividade de picada apresenta em regra dois picos: um a meio da manhã e outro ao final da tarde (Halstead, 2008). As fêmeas apresentam uma esperança média de vida de aproximadamente 8 a 15 dias, enquanto que os machos três a seis dias, o que depende de fatores como a humidade, nutrição e temperatura ambiente (Donalísio e Glasser, 2002). A dispersão autónoma dos adultos é

habitualmente limitada, aproximadamente 30-50 metros por dia para as fêmeas, o que significa que uma fêmea raramente visita mais do que duas ou três casas ao longo do seu ciclo de vida (Reiter *et al.*, 1995).

I.4. Principais métodos de controlo vetorial

O principal objetivo de um programa de controlo de vetores é a diminuição do contacto humanos-vetor, com a consequente redução da transmissão do agente etiológico até ao limiar crítico abaixo do qual a doença provocada por esse agente patogénico deixa de constituir um problema de saúde pública. A redução da densidade vetorial não depende de um único método, resulta da conjugação de vários métodos que se adequam à realidade local, e que permitam sua execução de forma integrada e seletiva (Collins *et al.*, 2000).

I.4.1. Métodos biológicos *s. s.*

O controlo biológico de mosquitos envolve a redução de uma população através da introdução no meio ambiente de inimigos naturais, tais como parasitas, agentes patogénicos, competidores, ou toxinas produzidas por um organismo e predadores. Estes, por sua vez, incluem insetos, vírus, bactérias, protozoários, fungos, plantas superiores, nemátodos e peixes. A eficácia da aplicação destes agentes requer bons conhecimentos da bioecologia dos insetos alvos, bem como dos seus biótipos. Este método, normalmente, revela ser mais vantajoso comparativamente aos inseticidas convencionais, pelo facto de ser específico para o seu alvo e de causar poucas alterações noutros organismos. Além disso, é possível que os agentes biológicos possam fornecer um controlo a longo prazo depois de uma única introdução.

Na natureza existem diversos organismos, que atuam como larvicidas nomeadamente:

-Peixes larvívoros como *Gambusia affinis* (Baird & Girard) introduzido em 1900 ou o *Poecilia reticulata* (Wilhelm C. H. Peters, 1859); os peixes preferencialmente utilizados no controlo biológico têm características de certo modo peculiares: devem ter como alimentos preferenciais os mosquitos relativamente aos outros alimentos

disponíveis, ser de pequenas dimensões, de modo a poderem penetrar entre a vegetação aquática, ter uma elevada taxa reprodutiva em pequenas porções de água, ser tolerantes à poluição, salinidade, flutuações térmicas e deslocação e também, convém que sejam autóctones das regiões onde se pretende fazer o controlo, (WHO, 1997).

Na última década a potencialidade de copépodes predadores (*Mesocyclops spp.*, Brown *et al.*, 1991; Kay *et al.*, 2002), crustáceos nocivos principalmente para as larvas dos mosquitos (*Aedes aegypti* e outros) em primeiro e segundo estágio, tem vindo a ser referida. Os macro-parasitas, como o *Romanomermis culicivorax* Ross & Smith, 1976 (Nematoda), que parasitam as larvas de mosquitos também revelaram-se como possíveis agentes de controlo biológico (Forattini, 2002, Lacey *et al.*, 2001). Resumindo, são referidos:

- Nemátodes, tais como mermitídeos, como agentes parasitários das larvas dos mosquitos.

- Microparasitas, agentes infecciosos que visam a redução da população de mosquitos, como alguns fungos dos géneros *Coelomomyces* Keilin, 1921, *Culicinomyces* Couch, 1974, *Lagenidium* Schenk, 1859 e algumas espécies de protozoários dos géneros *Amblyospora* Hazard & Oldacre 1975, *Parathelohania* Codreanu 1966 e *Edharzardia aedis* (Kudo, 1930). Atualmente bactérias larvicidas e produtos tóxicos das próprias bactérias, por exemplo, *Bacillus thuringiensis* (*Bti*) e *Bacillus sphaericus* Meyer & Neide, 1904 (Fathy, 2002), são os agentes patogénicos mais utilizados no controlo biológico. Estas bactérias vivem no solo, produzem toxinas de elevado poder inseticida que atuam a nível das células gástricas da larva, provocando lise. Uma das vantagens do uso dessas bactérias como larvicidas é o facto de serem inócuas para vertebrados, permitirem a sobrevivência de insetos benéficos e inimigos naturais e após cerca de 20 anos de utilização (*Bti*) não se tem registado o desenvolvimento de resistência em populações naturais. No entanto, apesar de ainda não se dispor de dados mais concretos, resultados de estudos laboratoriais, demonstraram que em algumas populações de mosquitos possa desenvolver-se resistência ao *Bti* (Tabashnik, 1994). Outra desvantagem à utilização do *Bti* é que este apresenta baixa estabilidade quando exposto ao meio ambiente e para que seja prolongada a ação inseticida há necessidade de várias aplicações. Em contrapartida *B. sphaericus* tem

algumas vantagens comparativamente ao *Bti*, pois é mais persistente em ambientes poluídos, podendo ser reciclado (não requer aplicações constantes), contudo o seu espectro de ação sobre mosquitos é menor quando comparado ao *Bti* (Lacey *et al.*, 2001).

-Fungos entomopatogénicos (*Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, Lord, 2005; Thomas *et al.*, 2007) como agentes patogénicos de mosquitos têm sido largamente explorados (Scholte *et al.*, 2003; Scholte *et al.*, 2004), especialmente no que se refere ao controlo de populações com elevado nível de resistência aos inseticidas químicos (Farenhorst *et al.*, 2009; Kikankie *et al.*, 2010; Howard *et al.*, 2010).

-Mosquitos predadores do género *Toxorhynchites* Theobald, 1901 (Culicidae), também são utilizados no controlo biológico.

-Nos vírus que atacam insetos, é de referir a família Baculoviridae. As partículas virais desta família são oclusas em corpos proteicos poliédricos, no caso do género *Nucleopolyedrovirus* (vírus de poliedrose nuclear), e em corpos granulares, no caso do granulovírus (vírus de granulose), (Azevedo, 1998). O mecanismo de ação é pela ingestão de plantas contaminadas com corpos proteicos de inclusão (CPIs) de baculovírus. Os CPIs virais são dissolvidos no intestino do mosquito, onde libertam os viriões (nucleocapsídeos mais envelope), cujas membranas se fundem às microvilosidades do intestino.

I.4.2. Métodos Ecológicos

Os métodos ecológicos consistem na modificação do meio físico e /ou biótico tornando-o desfavorável para as espécies alvo, nomeadamente através de intervenções de engenharia sanitária, (drenagens e aterros, uso de substâncias tensioativas nos biótopos), quer pela alteração do meio biótico (por recuperação de ecossistemas humanos empobrecidos, alteração de culturas, regularização da vegetação das margens de cursos de água). Este tipo de controlo pode ainda ter como objetivo a diminuição do contacto entre humanos e o vetor (aplicação de redes mosquiteiras nas habitações), que por consequência, irá diminuir a possibilidade de transmissão ao ser humano do agente patogénico, contribuindo assim, para a diminuição das taxas de transmissão da doença (WHO, 2009).

I.4.3. Métodos Genéticos

Os métodos genéticos têm como objectivo provocar ou induzir diretamente na espécie-alvo alterações genéticas desvantajosas ou indiretamente para o agente etiológico que transmite. Em 1955, Knippling propôs o conceito de introduzir insetos estéreis na população como forma de controlar pragas com importância agrícola, tendo sido esta técnica designada de SIT (“sterile insect technique”) (Knippling, 1955). Esta consiste na criação em massa, esterilização pela irradiação e libertação de um grande número de machos numa determinada área. Machos que ao acasalar com fêmeas locais reduzem a capacidade reprodutiva da população e por conseguinte a dimensão da mesma. A erradicação da população local pode ser conseguida com a libertação de um número suficiente de machos estéreis durante um determinado período de tempo. Esta técnica é específica para a espécie e é inócua para o ambiente. Outra técnica, também integrada nos métodos genéticos, é a RIDL [“Release of Insects Carrying a Dominant Lethal”, Thomas *et al.*, (2000)], que surgiu no ano 2000 e baseia-se na produção de mosquitos transgénicos, em que as fêmeas apresentam um gene letal passível de ser reprimido em criação laboratorial (para a manutenção em colónia), mas que quando expresso permite apenas a sobrevivência dos machos (Jansen e Beebe, 2010). Esta técnica está particularmente avançada no desenvolvimento de colónias de *Ae. aegypti*, em que as fêmeas produzidas apresentam um fenótipo incapaz de voar devido ao uso de um transgene no promotor do músculo que interfere no voo (Fu *et al.*, 2010).

Encontra-se em estudo uma nova estratégia de controlo baseada no uso de uma bactéria intracelular, endossimbionte, *Wolbachia*. Foi comprovado em estudos laboratoriais recentes, que certas estirpes de *Wolbachia* podem reduzir a capacidade do mosquito para transmitir doenças, inibindo diretamente a transmissão do agente patogénico ou reduzindo a sua longevidade (Hancock *et al.*, 2011).

I.4.4. Métodos Imunológicos

As vacinas anti vetoriais, ao diminuírem a longevidade ou fecundidade dos mosquitos, são uma potencial alternativa para o controlo vetorial, podendo fazer parte de um

programa integrado de controlo da malária, que continua a ser uma das prioridades definidas pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1994).

I.4.5. Métodos Químicos

Estes métodos consistem na aplicação de inseticidas, classificados quanto à origem, em inorgânicos (fluoretos, arseniatos entre outros) e orgânicos. Dentro dos orgânicos consideraremos para este caso os compostos naturais (piretrinas, rotenona, nicotina e outros), e os compostos de síntese (organoclorados, organofosfatos, carbamatos e piretróides). Para além destes, existem substâncias sinergistas, isto é, substâncias que têm a capacidade de potenciar a ação dos biocidas em geral e dos inseticidas em particular. Existem ainda constituintes vegetais, os semioquímicos, que também atuam ou como repelentes ou como atrativos, (Matos, 2000).

Quanto ao modo de ação, os inseticidas subdividem-se em inseticidas de ação direta, também designados por inseticidas verdadeiros, e inseticidas de ação indireta (Mendes, 1989). A maioria das substâncias usadas como inseticidas pertence ao primeiro grupo. Neste se enquadram as piretrinas, a rotenona e a nicotina, compostos sintéticos de uso tradicional e ainda os mais recentes como os organofosfatos, organoclorados ou os carbamatos (Guilherme *et al.*, 1986). Os inseticidas de ação indireta compreendem os repelentes, os atrativos, feromonas, reguladores de crescimento (ecdisonas, hormonas juvenis, hormonas anti juvenis), inibidores da oviposição e antifágicos (Koul, 1982; Johnson, 1983; Banerji *et al.*, 1985; Jain, 1987; Metcalf, 1987; Scalbert & Haslam, 1987; Mendes, 1989).

As substâncias larvicidas são aplicadas nos biótopos para induzir mortalidade larvar, contribuindo deste modo para a redução da densidade populacional. No final do século XIX, chegou-se a utilizar petróleo para controlar os mosquitos, mesmo antes de ter sido conhecido o papel de algumas espécies destes insetos no mecanismo de transmissão da malária. A aplicação do produto à superfície da água mata as larvas por asfixia ou por envenenamento com os vapores tóxicos. Este método tem a desvantagem de a sua aplicação numa grande superfície se tornar bastante dispendiosa, apresentar reduzida

eficácia onde há vegetação e efeito não duradouro com maior dispersão do agente com o vento e ser altamente nocivo em termos ambientais.

De 1921 até 1940 utilizou-se um composto de arsénico (cuja a formulação foi desenvolvida em 1867), conhecido pela designação de “verde paris” para o controlo de larvas de anofelíneos (Marquardt, 2010). Este pó verde é praticamente insolúvel em água, ficando as partículas à superfície de água contaminando e envenenando as larvas anofelíneas, que vêm à superfície para se alimentarem e respirarem.

O DDT (Dicloro-Difenil-Tricloroetano) causa alteração nos canais de sódio das células das membranas nervosas alterando o impulso nervoso, provocando movimentos convulsivos, fases sintomáticas de excitação, paralisia e subsequente morte do inseto, enquanto o BHC (Hexacloreto de benzeno) e ciclodienos (dieldrina) atuam nos recetores GABA (gama ácido aminobutírico). O DDT foi amplamente utilizado no século passado, contudo nos finais da década de 70, a Organização Mundial de Saúde proibiu a utilização de organoclorados devido aos seus efeitos ambientais adversos e a resistência dos mosquitos (Marquardt, 2010). Tornou-se perceptível que estes compostos têm efeito cumulativo no solo e nos tecidos animais e vegetais, o que constitui um inconveniente de reconhecida gravidade. Atualmente estes inseticidas são utilizados em caso excepcionais, em pulverizações intra-domiciliárias, podendo a sua ação perdurar por um período de um ano, após a sua aplicação.

Devido ao aparecimento de resistências aos organoclorados surgiram, como medida alternativa os organofosfatos, que são inseticidas com elevada toxicidade tanto para insetos como para mamíferos. Este problema foi ultrapassado em 1950 com a descoberta de um composto com vasto espetro de ação e reduzida toxicidade, o malatião. Os organofosfatos atuam pela inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) e pelo bloqueio da transmissão dos impulsos nervosos, apresentando como limitação a baixa especificidade, acabando por eliminar espécies inofensivas (Marquardt, 2010).

Os carbamatos atuam de forma semelhante aos organofosfatos, inibem a atividade da AChE, (Marquardt, 2010). Apesar de serem muito tóxicos para os mamíferos têm sido

particularmente utilizados em pulverizações intra-domiciliárias no controlo da malária em áreas da América Central.

Os piretróides foram desenvolvidos a partir das piretrinas, compostos ativos extraídos das flores do piretro (*Chrysanthemum* spp) e, tal como o DDT, atuam ao nível do canal de sódio das membranas das células nervosas. Entre o final de 1940 e 1950 surgiram vários compostos sintéticos de piretrina, muito instáveis com a exposição à radiação ultravioleta. Apresentam como vantagem o facto de se degradarem rapidamente no meio ambiente, não se acumulando nos ecossistemas, sendo portanto muito eficazes na luta contra os insetos com importância médica (Marquardt, 2010).

Em 1970 foram descobertas a permetrina, deltametrina e lambda-cialotrina, inseticidas de grande sucesso, por serem considerados de manipulação segura, estáveis à radiação atmosférica entre outras características, o que fez com que esta nova geração de inseticidas se tornasse o grupo com maior impacto comercial. Em 1995, o uso de piretróides representava 23% do mercado internacional de inseticidas (Soderlund, 2008). São utilizados em pulverizações intra-domiciliárias e constituem o único grupo de inseticidas licenciados pela OMS para impregnar redes mosquiteiras.

Resumindo, os compostos organofosfatos, os carbamatos e os piretróides, por se degradarem rapidamente no meio ambiente, deixam menos resíduos cumulativos e, por conseguinte, são recomendados como larvicidas no controlo dos mosquitos. Como os piretróides apresentam também elevada toxicidade para peixes, não é aconselhável a sua aplicação em controlo larvar de mosquitos.

De um modo geral, a contaminação da água por larvicidas é temporária e a maior parte dos elementos químicos degradam-se ao fim de alguns dias. Porém, conforme referido atrás, os organofosforados tendem a persistir como contaminantes durante mais tempo.

Dado o problema da resistência dos mosquitos à grande maioria dos larvicidas convencionais, torna-se imprescindível recorrer à utilização de medidas alternativas, nomeadamente óleos larvicidas, extratos vegetais, reguladores de crescimento dos

insetos, bactérias larvicidas, entre outras. Os últimos dois grupos referidos não são tóxicos para os peixes, mamíferos e outros organismos não-alvos.

Os larvicidas mais frequentemente utilizados são os organofosfatos, tais como o Abate (=Temephos), o fenitrotião e o clorpirifos.

Os piretróides tais como a deltametrina e a permetrina podem também ser utilizados como larvicidas. Contudo, como afetam não só os insectos, como já se referiram, mas também peixes, crustáceos e outros animais aquáticos, a sua aplicação torna-se restrita a casos específicos, sempre sob supervisão de equipas especializadas.

Os reguladores de crescimento de insetos (“IGR - Insect Growth Regulator”) são inseticidas de ação indireta, altamente tóxicos para os insetos, que atuam inibindo a formação de quitina nos estádios imaturos, comprometendo o seu desenvolvimento (Service, 2008). Têm como vantagem o facto de apresentar baixa toxicidade para os mamíferos, aves, peixes e insetos adultos mas, em contrapartida, são muito tóxicos para crustáceos e outros imaturos de insetos aquáticos. A sua utilização é limitada não só devido ao elevado custo, mas também à restrita disponibilidade nos países mais afetados.

O pireproxifeno é um exemplo bem conhecido de um composto “IGR”, tratando-se de uma hormona juvenil, análoga à dos insetos, que afeta muitos artrópodes. Os reguladores de crescimento têm sido usados no controlo de pragas agrícolas nas últimas décadas e têm sido eficazes também em mosquitos. Utilizada em baixas concentrações previne a emergência de *Ae. aegypti*. Doses muito baixas desta hormona podem também afetar os adultos reduzindo a fecundidade e a fertilidade. Tem ainda como vantagem adicional o facto da fêmea adulta contaminada poder transferir doses efetivas do referido composto para qualquer biótopo por onde ela passa (McCall e Kittayapong, 2007). Novas fórmulas deste produto têm sido desenvolvidas para prolongar a sua eficácia por mais tempo e deste modo reduzir a necessidade da sua reaplicação (Sihuinha *et al.*, 2005).

De entre os inseticidas de ação indireta encontram-se ainda as feromonas, compostos que interferem na comunicação entre indivíduos da mesma espécie. Não possuem ação

pesticida, mas as suas características biológicas permitem a sua utilização no controlo de pragas (Silverstein, 1981; Mendes, 1989). As feromonas podem ser usadas como atrativos em armadilhas, reduzindo diretamente a densidade da população, ou podem ser difundidas no ar induzindo alterações comportamentais, como por exemplo, dificuldade de os machos localizar as fêmeas, diminuindo-se deste modo o número de acasalamentos, e a densidade populacional (Matos, 2000).

Quando se faz o controlo químico dos mosquitos na fase adulta, as estratégias de aplicação dependem em grande parte dos hábitos de alimentação e repouso da espécie-alvo.

Um dos primeiros mecanismos de aplicação de inseticida na exterminação de mosquitos em repouso foi as “Flit-guns”, designação devida ao nome comercial do inseticida pulverizado. As versões mais modernas destes aspersores individuais ainda hoje são usadas quer em pulverizações intra-domiciliárias quer na nebulização de pequenas áreas de vegetação. Quando devidamente usado torna-se um valioso método de prevenção (Service, 1986).

O conhecimento dos hábitos de repouso dos mosquitos adultos, no interior das habitações antes e/ou depois da refeição sanguínea, torna-se relevante nas campanhas de controlo baseadas na pulverização de superfícies interiores, como paredes e telhados de habitações ou de abrigos para animais, com inseticidas residuais (Service, 1986). A pulverização residual de interiores é vulgarmente designada pela sigla IRS (*indoor residual spraying*) e é uma das principais intervenções no controlo dos vetores da malária (van der Berg, 2009; Vatandoost *et al.*, 2009).

Quando o mosquito vetor apresenta hábitos exofílicos, as aplicações de inseticida têm de ser efectuadas no exterior. O principal volume de qualquer formulação líquida de um inseticida consiste no solvente, sendo a quantidade do inseticida ativo reduzida. Aumenta-se a eficiência da aplicação se a concentração da solução inseticida pulverizada for escassa, mas dispersa num grande volume de solvente, numa dada área. Esta aplicação, conhecida como ULV (*ultra-low-volume*), é normalmente feita com recurso a veículos automóveis ou aviões em áreas extensas. Os inseticidas utilizados em

nebulizações ULV, em regra, atuam principalmente sobre a parcela da população de culicídeos que se encontra ativa podendo, no entanto, afectar parte da população que se encontra em repouso em locais expostos. A pulverização ULV pode ser usada para prevenir ou controlar actuais surtos epidémicos, sendo que em situações de emergência a pulverização aérea permite um controlo vetorial mais rápido e eficaz. Este tipo de controlo tem sido usado para reduzir drasticamente a transmissão da dengue hemorrágica na América do Norte (Service, 2008).

Os inseticidas químicos continuam a ter muita relevância nos programas de luta integrada contra os vetores. No entanto, o arsenal de inseticidas seguros e eficazes tem vindo a reduzir-se devido, quer ao aumento das resistências causado pela utilização intensiva e/ou incorrecta de inseticidas sintéticos (consequência da insustentabilidade económica dos actuais programas de controlo), quer aos efeitos adversos ambientais e em saúde pública (Zaim e Guillet, 2002).

I.4.6 Repelentes como medida de protecção individual

Os repelentes, apesar de não serem classificados como inseticidas, são na sua grande parte compostos sintéticos, que podem ser aplicados na pele ou roupa para prevenir ataques de insetos, carraças e ácaros ofensivos. A sua aplicação é aconselhável em situações em que outras medidas de controlo não são praticáveis ou são impossíveis de ser implementadas, podendo ainda ser utilizados como método de controlo complementar.

O período de maior atividade de picada de uma população de insetos dura em média cerca de duas a quatro horas, mas o tempo de repelência de um composto químico é condicionado por fatores como a atividade e o grau de transpiração do indivíduo, a temperatura ambiente ou a espécie de inseto. No entanto, em muitas circunstâncias, a aplicação de repelente sobre a roupa/pele exposta pode ser o único meio possível de protecção contra picadas de insetos. Visto ser necessária uma única picada de um artrópode infetado para a transmissão do agente patogénico, torna-se crucial a pesquisa de novos produtos repelentes que forneçam uma protecção eficiente e prolongada. Os

repelentes de insetos comerciais disponíveis normalmente são subdivididos em duas categorias - os sintetizados quimicamente e os derivados de óleos essenciais (Fradin & Day, 2002).

O DEET (N,N-dimetil-meta-toluamida) é o repelente sintético mais usado desde 1950 e considerado o produto padrão em relação a todos os outros repelentes, apesar da sua eficácia ter consideráveis efeitos adversos, não oferecendo uma proteção eficaz a longo prazo.

Apesar do mecanismo de ação e do alvo molecular do DEET não serem ainda conhecidos, estudos mostraram que este composto causa um bloqueio nas respostas electrofisiológicas, nos neurónios sensoriais olfativos, aos odores atrativos em *An. gambiae* e *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830. O DEET, que tem sido o repelente de insetos “de eleição”, tem apresentado problemas de toxicidade, pelo que a sua utilização está a ser posta em causa. Assim, aumenta a necessidade de pesquisa de novas substâncias para uso como repelente.

Os seres humanos ao longo dos tempos têm vindo a usar compostos derivados de plantas, tais como o eucalipto e a citronela ou mesmo incensos, para repelir picadas de insetos. Nos últimos anos, a utilização deste tipo de repelentes tem aumentado como uma alternativa viável aos inseticidas sintéticos.

O óleo de citronela, extraído de várias espécies de *Cymbopogon* (erva citronela), apesar de demonstrar boa eficácia contra mosquitos, pode causar irritação em peles sensíveis e dermatites em alguns indivíduos, pelo que a sua aplicação apresenta limitações.

Um repelente eficiente e seguro tornar-se-á útil na redução do contato humano-vetor e, consequentemente contribuirá para a interrupção da transmissão de doenças por vetores (Karunamoorthi & Sabesan, 2009; Logan *et al.*, 2010). Os repelentes de insetos são uma alternativa económica ao controlo vetorial por inseticidas (Vatandoost & Hanafi-Bojd, 2008), não obstante a sua referida limitação.

A tecnologia de microencapsulação, uma tentativa corrente de resolver o problema da durabilidade dos inseticidas piretróides, também dos repelentes, tem demonstrado qualidades acrescidas para reduzir o impacto ambiental dos pesticidas e melhorar o seu perfil toxicológico. Esta metodologia consiste na inclusão de um ingrediente ativo numa cápsula de polímero e a sua libertação gradual para o exterior, permitindo um prolongamento da sua atividade residual. A microcápsula fornece um local de armazenamento de uma determinada quantidade do agente funcional e um escudo protetor aos efeitos solares, à humidade e ao oxigénio. A libertação do agente funcional ocorre por difusão através da cápsula e/ou ruptura das microcápsulas.

Suspensões microencapsuladas de piretróides estão a ser comercializadas como “sprays” residuais de interiores. A micro-encapsulação revelou outras vantagens tais como redução do impacto ambiental dos pesticidas e melhoramento do perfil toxicológico.

Uma das metodologias emergentes mais eficazes para a aplicação dérmica de repelentes naturais consiste na preparação de emulsões micrómetras, designadas de nano-emulsões ou mini-emulsões. As nano-emulsões são dispersões óleo-água com gotículas de tamanho compreendido de 100 a 600nm. Têm como vantagem a estabilidade cinética, uma solidez física a longo prazo e são hidrossolúveis sem alteração do seu tamanho, ao contrário das micro-emulsões. Preparados de nano-emulsões com óleo de citronela encapsulado por homogeneização a alta pressão, levaram a uma libertação lenta do óleo, aumentando o tempo de proteção contra mosquitos (Sakulku *et al.*, 2009).

Apesar dos produtos químicos como repelentes de mosquitos serem potencialmente promissores, impera a necessidade de se encontrar repelentes naturais para o uso comum por populações em zonas endémicas, especialmente aqueles que possam ser cultivados localmente e processados com baixa tecnologia.

A aplicação de repelentes em tecidos, roupas ou redes é um recurso ainda pouco estudado que tem potenciais benefícios em termos de segurança, nomeadamente na redução da exposição direta a químicos mais tóxicos.

I.4.7. Bioinseticidas

Como tem sido referido, a resistência aos inseticidas tem ocorrido na maioria dos artrópodes, nomeadamente nos vetores de agentes patogénicos para seres humanos. Em 1992, a lista de espécies vetoras resistentes a inseticidas incluía 56 mosquitos anofelíneos e 39 mosquitos culicíneos, piolhos, percevejos, triatomíneos, oito espécies de pulgas e nove espécies de carraças (WHO, 1992). A resistência surgiu para todas as classes químicas de inseticidas, incluindo microbianos e reguladores de crescimento de insetos (Brogdon *et al.*, 1998).

Os produtos naturais de origem vegetal ressurgem como uma promissora fonte de substâncias bioativas potencialmente úteis na luta química contra os insetos, atuando como ovicidas, larvicidas e/ou adulticidas. Dado que a sua síntese está muitas vezes associada aos mecanismos de defesa das plantas contra inimigos naturais (Mello e Silva-Filho, 2002), os compostos biossintetizados pelas plantas, metabolitos secundários, apresentam geralmente maior especificidade para os organismos-alvo, são biodegradáveis e comportam menores riscos ambientais (Sukumar *et al.*, 1991; Matos, 2000; Grayer *et al.*, 2001). Um vasto número de diferentes espécies de plantas, de várias regiões geográficas, tem revelado potencialidades fitoquímicas, capazes de causar vários efeitos de toxicidade aguda ou crónica nos insetos (Rocha, 2003; Rasheed *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2006; Amer & Mehlhorn, 2006 a, b; Rocha, *et al.*, 2008, Rose *et al.*, 2009, Benelli *et al.*, 2012).

Extratos vegetais de diversas plantas demonstraram efeitos adversos na fecundação e na eclosão dos ovos de mosquitos, exibiram propriedades larvicidas significativas e promissoras, incluindo ainda efeitos como reguladores de crescimento (Shaalan *et al.*, 2005; Tabanca *et al.* 2012; Giatropoulos *et al.* 2012). Piretro, derris, quassia, nicotina, anabasina, azadiractina, D-limoneno, cânfora e turpentina são exemplos de importantes fitoquímicos inseticidas usados principalmente nos países desenvolvidos, antes da introdução dos inseticidas orgânicos sintéticos (Wood, 2003; Sukumar *et al.*, 1991).

Nos últimos anos, os OEs obtidos de plantas têm sido considerados potenciais fontes de substâncias biologicamente ativas no controlo de vetores (Kelsey *et al.*, 1984). Os OEs são misturas voláteis, geralmente aromáticas, obtidas por arrastamento de vapor de água, sendo normalmente produtos muito complexos e que têm na sua composição principalmente terpenos, com diferentes grupos funcionais, como por exemplo, álcoois (*e.g.* mentol), ésteres, cetonas (*e.g.* carvona) e aldeídos (*e.g.* citronelal), entre outros (Simas *et al.*, 2004; Sangwan *et al.*, 2001). Muitos destes compostos apresentam propriedades biocidas, nomeadamente inseticidas, como é o caso da pulegona (Grundy & Still, 1985), bactericidas como o carvacrol (Russel, 1986), fungicidas como o citral e o citronelol (Duke, 1992; Gata-Gonçalves *et al.*, 2003) e herbicidas como o limoneno (Lydon & Duke, 1989).

Apesar de reconhecidas vantagens, como a ação e degradação rápidas, toxicidade baixa a moderada para mamíferos, maior seletividade e baixa fitotoxicidade, os bio inseticidas apresentam algumas desvantagens, como necessidade de utilização de composto sinergista, baixa persistência, carência de pesquisas, escassez do recurso natural, necessidade de padronização química e controle de qualidade, dificuldade de registo e custo. Além disso, a falta de dados relacionados à fitotoxicidade, à persistência e aos efeitos sobre organismos benéficos e as dificuldades relacionadas ao isolamento de princípios ativos e a concentração em diferentes partes vegetais, também são algumas barreiras a serem ultrapassadas e mais estudos nesta área ainda são necessários (Isman, 2000; Costa *et al.*, 2004; Menezes, 2005).

I.4.8. Proteção Integrada

Este meio de luta consiste na utilização conjugada de uma grande diversidade de métodos, que abrange desde o controlo biológico às mobilizações mecânicas, ou até, ao uso controlado de inseticidas químicos. Neste tipo de prática tenta-se conciliar os factores qualidade, rentabilidade e preservação ambiental (Matos, 2000, Forattini, 2002).

O combate à malária e às arboviroses implica um esforço contínuo e integrado da investigação, quer ao nível da prevenção, quer ao nível do tratamento das doenças. O recurso a inseticidas sintéticos para o controlo das populações de mosquitos vetores de agentes patogénicos tem sido questionado, não só devido a fatores relacionados com a resistência dos mesmos aos inseticidas químicos como também às repercussões ambientais, consequência da utilização destes. Por outro lado, e na grande maioria dos casos, a não existência de vacinas eficazes e a resistência múltipla dos agentes patogénicos aos fármacos, reforçam a importância da utilização simultânea de várias abordagens no controlo dos mosquitos vetores, tendo como objetivo a diminuição da transmissão da(s) doença(s) a eles associadas.

Um dos mais eficientes métodos de controlo de *Ae. aegypti* é feito através da eliminação de biótopos favoráveis à oviposição e que permitem o desenvolvimento das fases imaturas. Embora esta estratégia seja usada com sucesso, está limitada ao nível do compromisso da comunidade e ao facto de que por vezes os contentores mais produtivos são, frequentemente, os que não podem ser inutilizados ou esvaziados (*e.g.* poços de reserva de água). Nestes casos, o tratamento com larvicidas é permitido e aprovado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), podendo ser utilizados compostos como o temefos, permetrina, piriproxifeno assim como o biocida *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) (Goldberg, 1979) (McCall e Kittayapong, 2007).

O controlo químico continua a ser a principal componente de programas de controlo da malária e, segundo a OMS, quatro classes de inseticidas químicos asseguram os programas de controlo vetorial: organoclorados, organofosfatos, carbamatos e piretróides. Os inseticidas piretróides são atualmente os únicos químicos recomendados pela WHOPES (World Health Organization Pesticide Scheme) para impregnação de redes, devido à sua baixa toxicidade para mamíferos e rápida atuação contra os mosquitos (Pennetier *et al.*, 2007; Pennetier *et al.*, 2009). É de salientar a importância de técnicas de pulverização interior, considerada uma das formas mais eficazes de evitar surtos epidémicos de malária no caso de vetores com hábitos endofílicos e endofágicos, para além da gestão ambiental.

O controlo vetorial visa a redução da densidade do vetor e do contacto hospedeiro /vetor pelo que, o controlo vetorial compreende diferentes estádios do ciclo de vida do mosquito, devendo conjugar métodos químicos, biológicos, ordenamento territorial, manipulação ambiental e medidas de proteção individual e coletiva.

I.5. Modo de ação dos inseticidas

O sistema nervoso dos insetos, mais especificamente a sinalização nervosa, tem sido considerado o alvo mais provável da ação dos OEs. Até a data, reconhecem-se várias formas de atuação atribuídas aos inseticidas de síntese comercializados. Como é possível constatar na Tabela 1, no mercado dos inseticidas existe uma elevada prevalência dos inibidores da acetilcolinaesterase (AChE), a enzima responsável pela clivagem do neurotransmissor acetilcolina. Para além destes, destacam-se os compostos que interferem ao nível dos canais de sódio (VgSCh) envolvidos na polarização e despolarização das células nervosas e propagação dos potenciais de ação. Segundo Nauen e Bretschneider (2002), ambos os tipos de inseticidas constituíam, há uma década atrás, cerca de 70% do mercado mundial.

Os modos de atuação dos inseticidas sintéticos são de facto diversos. Para além dos referidos acima, outras classes de compostos podem interferir a diferentes níveis do sistema nervoso. Alguns compostos podem atuar como ligandos de recetores, desempenhando o papel de antagonistas dos recetores acetilcolina nicotínicos (nAChRs), localizados no sistema nervoso central dos insetos. Por outro lado, referem-se os compostos antagonistas que atuam ao nível dos recetores do ácido γ -aminobutírico (GABA), situados no sistema nervoso central e periférico dos insetos (Nauen e Bretschneider, 2002). Outros inseticidas atuam a nível da respiração celular, mais especificamente ao nível da mitocôndria, inibindo alguns complexos da cadeia de transporte de electrões ou funcionando como desacopladores entre o processo da fosforilação oxidativa e a cadeia de transporte (Nauen e Bretschneider, 2002). Por outro lado, destacam-se os análogos das hormonas ecdisonas (esteróide) e hormona juvenil (sesquiterpenóide) como alternativas promissoras no controlo dos insetos (Dhadialla *et al.* 1998). Estes compostos mimetizam o efeito das hormonas responsáveis pela

iniciação e coordenação dos processos de muda larvar e de metamorfose, funcionando como aceleradores nas mudas dos insetos (Nauen e Bretschneider, 2002).

Tabela 1 - Modos de ação dos 100 inseticidas/acaricidas mais vendidos.

Modos de ação	% Vendas	Exemplo
Acetilcolinaesterase	52	Carbamatos e Organofosfatos
Canais de sódio	18	DDT, Piretróides, Isobutilamidas
Recetores de acetilcolina	12	Neonicotinoides, <i>Spinosad</i> (agonistas)
Gaba recetores / canais de Cloro	8,3	Arilamino-pirazol, <i>Dieldrin</i>
Biossíntese da quitina	3,0	Benzoilfenilureas
NADH desidrogenase	1,2	Rotenona, Piericidinas
Desacopladores	0,7	Dinitrofenóis, <i>Chlorfenapyr</i>
Recetores Octopamina	0,6	Óleos essenciais
Recetores Ecdisona	0,4	Tebufenozide, metoxifenozeide, Halofenozeide

(adaptada de Nauen e Bretschneider, 2002)

O mecanismo de atuação dos constituintes de OEs, ainda é pouco conhecido. No entanto, já se sabe que alguns destes constituintes podem desempenhar um papel inibitório na atividade da enzima acetilcolinaesterase (AChE), tal como se verifica para a maioria dos inseticidas. A inativação ou inibição desta última pode ser irreversível e resultar numa acumulação do neurotransmissor acetilcolina nas fendas sinápticas e nas junções neuromusculares. Desta acumulação de acetilcolina resulta uma estimulação contínua das fibras colinérgicas e do sistema nervoso central e periférico tendo como consequência final a paralisia e a morte (Shaaya & Rafaeli, 2007).

Para além da AChE a octopamina desempenha múltiplos papéis nas funções fisiológicas dos invertebrados podendo atuar como neurotransmissor, neurohormona, e neuromodulador de uma forma análoga a norepinefrina dos vertebrados (Kostyukovsky *et al.*, 2002). Atualmente foram identificados pelo menos três tipos diferentes de recetores octopaminérgicos nos insetos (Evans e Robb, 1993), cada um acoplado a sistemas distintos de mensageiros secundários (Kostyukovsky *et al.*, 2002).

I.6. Mecanismos de Resistência a inseticidas em mosquitos

O desenvolvimento de estratégias efetivas na gestão de resistências aos inseticidas torna-se imperativo na atualidade, visto que a nível global continua a aumentar o número de populações de mosquitos resistentes, e na proporção inversa a disponibilidade de inseticidas eficazes. O desenvolvimento de tais estratégias tem sido suportado, principalmente, pelos recentes avanços no conhecimento da bioquímica e genética molecular dos mecanismos de resistência, assim como, no estudo da ecologia, fisiologia e dinâmica populacional das espécies culicídeas (Georghiou, 1994).

Entende-se por resistência “a habilidade adquirida de uma estirpe de organismo para sobreviver a doses de um tóxico que mataria a maioria dos indivíduos numa população normal da mesma espécie” (Braga e Valle, 2007).

Existem dois tipos de resistência nos insetos, a fisiológica e a comportamental, sendo a primeira a mais importante. O desenvolvimento de resistência fisiológica numa população de insetos está dependente do aparecimento de alterações genéticas e da sua seleção artificial devido ao contínuo uso de inseticidas. A evolução da resistência numa população depende de vários fatores incluindo a proporção de indivíduos originalmente resistentes, o grau de isolamento da população em comparação com as populações vizinhas não sujeitas a inseticidas, a taxa de reprodução e o tempo de geração do inseto. Este tipo de resistência pode surgir de diferentes mecanismos: (i) através do incremento da capacidade de um inseto metabolizar o inseticida num produto menos tóxico (designada de resistência metabólica); (ii) da absorção e armazenamento do inseticida nos tecidos; (iii) do aumento da impermeabilidade do tegumento ou da taxa de excreção do inseticida ou, ainda (iv) pela diminuição da sensibilidade do alvo-local deste (denominada de resistência local-alvo). Quando se suspeita de resistência nos vetores, devem-se realizar testes standardizados pela OMS para determinar o nível de resistência. Basicamente, estes testes consistem na exposição de um elevado número de mosquitos a diferentes concentrações, de um ou mais inseticidas, e a contagem do número de insetos mortos, após um determinado período de exposição (Service, 1980).

A resistência comportamental diz respeito a capacidade dos vetores evitarem o contato com o inseticida, quer por mudanças de habitat quer por alteração de comportamento. Um exemplo de mudança comportamental é a alteração dos hábitos de repouso: mosquitos que originalmente são endofílicos, mas que devido ao contacto contínuo com o inseticida tornaram-se predominantemente exofílicos. A resistência resultante de mudanças comportamentais/ecológicas são consideravelmente mais difíceis de reconhecer e de quantificar do que as fisiológicas. Contudo, a OMS disponibiliza um *kit* padrão para medir este parâmetro nos mosquitos (Service, 1980)

Em sùmula, a resistência a inseticidas é tipicamente caraterizada por uma variedade de alterações moleculares, tais como mudanças transcricionais, amplificação de genes e mutações em regiões codificantes, que resultam no aumento da taxa de desintoxicação de inseticidas (resistência metabólica) ou na perda de sensibilidade dos seus locais alvo (resistência local-alvo) (Vontas *et al.*, 2010) (Figura 7).

Casos pontuais de resistência aos inseticidas baseados em alterações comportamentais também têm sido descritos (Hayes e Wolf, 1997), mas a sua existência é de difícil comprovação e normalmente surge em combinação com outro mecanismo de resistência (Taylor e Headley, 1975).

O uso intensivo de piretróides no controlo de artrópodes levou ao desenvolvimento de resistências a estes compostos. Um importante mecanismo de resistência é conhecido como “knock-down resistance” (*kdr*). Os insetos que exibem *kdr* apresentam uma sensibilidade reduzida do local alvo dos piretróides e DDT, resultado de uma ou mais mutações na proteína do canal de sódio do inseto. O importante papel dos canais de sódio na resistência a inseticidas deu origem a vários estudos da sua estrutura e funcionamento nos insetos (Dong, 2007).

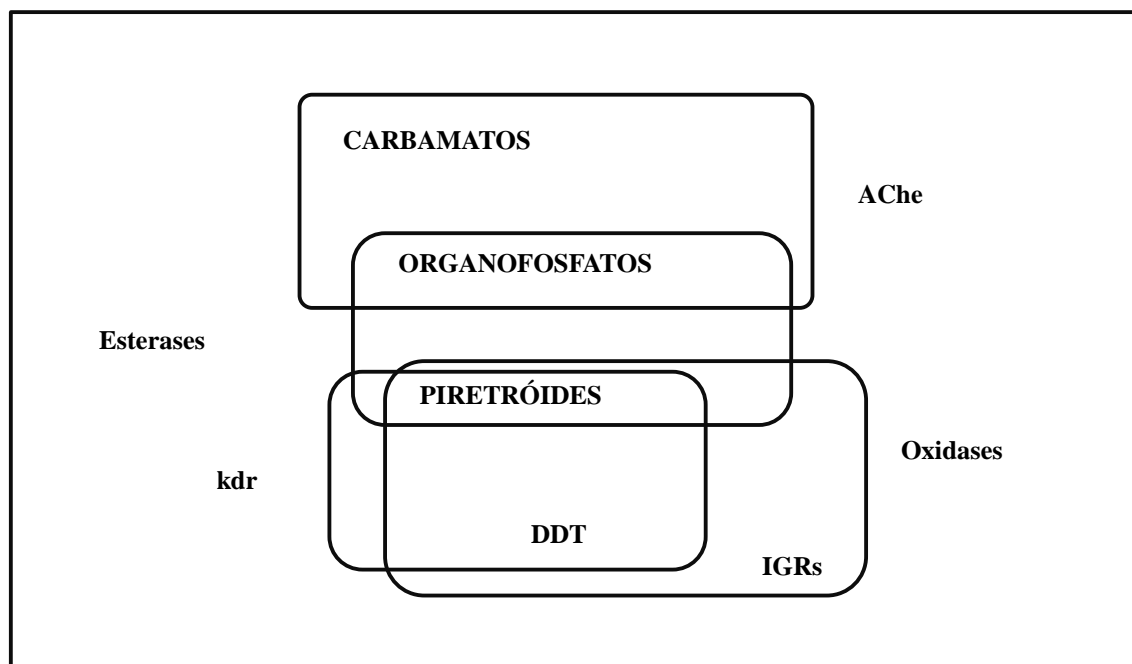


Figura 7 - Representação esquemática dos principais mecanismos envolvidos na resistência às várias classes de inseticidas. Adaptado de Brogdon e McAllister, 1998. Legenda: **AChE** - acetilcolinesterase; **kdr** - “knock-down resistance”; **IGRs** - “Insect Growth Regulators”; **DDT** - Dicloro-Difenil-Tricloroetano.

A *kdr* ocorre devido à mudança de afinidade entre o inseticida e o seu local alvo no canal de sódio. É possível que um número limitado de mutações no local alvo possa levar à insensibilidade do nervo. No total, cerca de 20 polimorfismos nas sequências de aminoácidos do canal de sódio foram identificados e associados à resistência aos piretróides (Hemingway *et al.*, 2004).

A acetilcolinesterase (AChE) é o local alvo dos organofosfatos e carbamatos. Esta enzima é a responsável pela degradação da acetilcolina, neurotransmissor que, quando presente na fenda sináptica, promove a propagação do impulso nervoso, uma vez que provoca a abertura de canais de sódio na célula pós-sináptica. Numa situação normal, após o fim do estímulo, a acetilcolina é removida por recaptação ou por degradação enzimática, efetuada pela AChE. Os organofosfatos e carbamatos atuam inibindo a AChE e, em consequência, a acetilcolina permanece na fenda sináptica e o impulso não termina, levando à morte do inseto (Braga e Valle, 2007). Nestes casos, a resistência

está relacionada com afinidade reduzida da AChE pelo inseticida, o que permite a interrupção normal – ou quase – do estímulo nervoso (Brogdon e McAllister, 1998; French-Constant *et al.*, 1998; Hemingway, 2000).

Os recetores do ácido gama-aminobutírico (GABA) são o local alvo dos ciclodienos e organoclorados. Pertencem a uma superfamília de recetores presentes nas junções sinápticas do sistema nervoso central e das sinapses neuromusculares dos insetos (Hemingway, 2000). Os inseticidas atuam sobre os recetores GABA, impedindo a entrada de iões cloro para o meio intracelular e, com isso, provocando a emissão de impulsos espontâneos que levam à contração muscular, convulsões, paralisia e morte (Braga e Valle, 2007).

Os mecanismos mais comuns de resistência metabólica envolvem esterases, glutatíon S-transferases (GSTs) e monooxigenases. A maioria dos casos de resistência metabólica, pode ser detetada através da comparação do nível da atividade destes enzimas entre a população em estudo e uma colónia da mesma espécie tipificada como sensível. Na última década, com os avanços do conhecimento da base molecular destes mecanismos de resistência espera-se, que num futuro próximo, através da manipulação dos padrões de expressão destes sistemas enzimáticos, poder-se restaurar a suscetibilidade aos inseticidas em populações atualmente resistentes (Hemingway, 2000).

A resistência mediada por esterases é comum em vários insetos. As esterases tanto produzem uma resistência de amplo espectro aos inseticidas, através de uma rápida ligação e consequente sequestração do composto, como produzem uma resistência de curto espectro, através do metabolismo de uma restrita classe de inseticidas contendo uma ligação éster. Fenómenos de amplificação génica estão, frequentemente, na base da resistência mediada por esterases através de mecanismos de sequestração do composto inseticida. Por outro lado, a presença de resistência como resultado de um aumento da taxa metabólica destes enzimas pode estar associada a mutações em genes estruturais. Este mecanismo envolve principalmente a resistência aos organofosfatos, nomeadamente, o malatíon (Hemingway, 2000).

As monooxigenases citocromo P450-dependente formam um importante sistema metabólico envolvido na regulação de títulos de compostos endógenos tais como hormonas (*e.g.* esteróides), ácidos gordos. Estão ainda envolvidas no catabolismo e anabolismo de xenobióticos tais como drogas, pesticidas e toxinas de plantas. Em eucariotas, as P450s encontram-se no retículo endoplasmático e na mitocôndria (Scott, 1999).

Nos insetos, as monooxigenases atuam de modo semelhante participando em mecanismos associados ao crescimento, desenvolvimento, alimentação, resistência e tolerância a inseticidas e toxinas. Além disso, as monooxigenases estão intimamente ligadas à síntese e degradação de hormonas de inseto e feromonas. Por exemplo, indutores (ou inibidores) das P450s podem produzir mudanças no desenvolvimento, morfologia e/ou sobrevivência de insetos holometabólicos, muito provavelmente devido à alteração dos títulos de hormonas via indução ou inibição de uma ou mais P450s (Scott, 1999).

A resistência a inseticidas mediada por monooxigenases é possivelmente o mais frequente tipo de metabolismo encontrado. A importância das monooxigenases na resistência a inseticidas ficou evidente em 1960, quando foi mostrado que a resistência ao carbaril podia ser anulada por um inibidor das P450s (Scott, 1999). A desintoxicação metabólica é frequentemente associada com a atividade das monooxigenases, nomeadamente nos casos de resistência específica aos piretróides. No entanto, esterases não específicas e GSTs elevadas também já demonstraram conferir resistência aos piretróides (Bregues *et al.*, 2003).

I.7. Espécies vegetais em estudo e sua importância

Este subcapítulo engloba caracterização mais relevante das espécies vegetais em estudo, sob o ponto de vista: botânico, propriedades, aplicações medicinais e biocidas habituais, de *Azadirachta indica*, *Foeniculum vulgare*, *Melia azedarach*, *Mentha pulegium* e *Sambucus nigra*. Este conjunto de plantas foi selecionado, a partir de estudos

preliminares de avaliação de propriedades inseticidas, tendo sido escolhidas as mais eficazes.

Apresentam-se as espécies estudadas por ordem de obtenção do material e o seu processamento em laboratório.

Os nomes científicos apresentam-se segundo o sistema filogenético de classificação das plantas com flor: “The Angiosperm Phylogeny Group” (APG III) baseado na sistemática molecular.

I.7.1. *Sambucus nigra*

Família: ADOXACEAE

Género: *Sambucus* L.

Espécie: *Sambucus nigra* L. (Figura 8)



Figura 8 - *Sambucus nigra*
(fotografia da autora).

Carateres morfológicos

Arbusto ou pequena árvore rizomatosa, caducifólia; caule muito ramificado com ritidoma sulcado, suberoso e lenticulado.

Folhas opostas, estipuladas, com 5-7 segmentos; segmentos peciolulados, até cerca de 10 x 5 cm, ovado-lanceolados a ovado-elípticos, ápice acuminado, margem serrada, levemente pubescentes nas nervuras da página inferior.

Flores pequenas, bissexuadas, actinomórficas e pentâmeras, reunidas em grandes corimbos compostos; cálice tubuloso, lobos curtos, triangulares e persistentes; corola rodada, branca, lobos imbricados, arredondados; estames inseridos na parte superior do tubo da corola, alternos com os lobos da corola; ovário semi-ínfero, 3-5 loculado, estilete simples e curto, estigmas 3-5 capitados.

Fruto drupáceo, com cerca de 6,5 mm de diâmetro, globoso, negro.

Carateres ecológicos

Cresce e desenvolve-se em climas temperados, em altitudes inferiores a 1700 m, normalmente em zonas influenciadas por cursos de água, matas, sebes húmidas e sombrias, mas também prospera em solos secos ou locais quentes e com muita luz.

Vive bem em qualquer tipo de solo, como ácido ou muito alcalino. Tolerância à poluição atmosférica e locais costeiros. É resistente à poda, regenerando mesmo quando cortada pela base (6).

Ocorrência

Ocorre naturalmente em grande parte da Europa e Oeste e Sudoeste da Ásia.

Em Portugal ocorre em grande parte do território, exceto no sudoeste ocidental e centro Oeste do vale do rio Tejo.

Encontra-se introduzida e naturalizada em diversas regiões temperadas do mundo, como Norte de África e Macaronésia.

Nomes vulgares portugueses

Candelheiro, canineiro, flor-de-sabugueiro, galacrista, rosa-de-bem-fazer, sabugo, sabugueiro, sabugueiro-negro, sabugueiro-preto (7).

Propriedades e usos mais frequentes

As folhas de *S. nigra* são ricas em glicósido samburígina-amigdalina, benzaldeído e ácido cianídrico. Devido à forte ação repelente destes compostos ativos a infusão das folhas de sabugueiro pode também ser utilizada para evitar picadas de mosquitos e de outros insetos. Na literatura existem poucas referências à sua atividade nos insetos.

Esta planta é usada em diversas áreas: gastronomia (em doces), tintureira (usada em vinho e em tecidos), inseticida, repelente de vertebrados; medicinal (aparelho respiratório, digestivo, contra diarreias e queimaduras bem como tratamento para diabéticos, também medicinal para o gado).

O sabugueiro é um arbusto que está largamente representado em Portugal, onde é usado e visto com interesse na produção de bebidas e na indústria alimentar (uso das antocianinas e corantes alimentares), sendo uma cultura de importância económica

crescente em algumas regiões do norte e centro (*e.g.* região de Tarouca) (<http://bagasabugueiro.blogspot.pt/2006/12/caractersticas-e-propriedades.html>), pelo que é muitas vezes cultivado.

I.7.2. *Melia azedarach*

Família: MELIACEAE

Género: *Melia* L.

Espécie: *Melia azedarach* L. (Figura 9)



Figura 9 - *M. azedarach*
em floração (fotografia da
autora).

Carateres morfológicos

Árvore até 10-15 m de altura, caducifólia nas zonas temperadas e perenifólia nas tropicais húmidas; tronco ereto, cilíndrico, com ritidoma cinzento-acastanhado, liso quando novo, esfoliando-se longitudinalmente com a idade; copa arredondada.

Folhas alternas, compostas, em geral bipinadas, até 40 cm de comprimento; pecíolo, ráquis e peciolulos, em geral, plano-convexos, um pouco alados; folíolos 3-11, opostos a sub-opostos, curtamente peciolulados, de limbo até cerca de 7 x 3 cm, ovado a ovado-lanceolado, ápice acuminado, margem serrada a crenada, base acunheada e assimétrica, verde-escuro na página superior, mais claro, puberulento e glanduloso na inferior, exalando um forte odor quando macerados.

Flores numerosas e perfumadas, poligâmicas (bissexuadas e masculinas no mesmo indivíduo), reunidas em grandes panículas compostas de cimeiras, axilares; pedicelos curtos; cálice curto, profundamente partido, puberulento externamente; corola de 5 pétalas livres com cerca de 1 cm de comprimento, linear-espatuladas, margem glandulosa, lilacíneas; estames até 12, com os filetes unidos num tubo estaminal, mais curto que as pétalas, purpúreo a violáceo; ovário súpero, em geral com 5 lóculos, estilete mais curto que o tubo estaminal, estigma capitado com 5 lóbulos.

Fruto drupáceo, com cerca de 15 mm de diâmetro, globoso a elipsoide, amarelo-claro e liso, podendo tornar-se acastanhado e enrugado, glabro, persistente.

Carateres ecológicos

M. azedarach adapta-se e vive numa grande amplitude de condições tanto de solo como de temperatura, sobretudo em climas temperados-quentes a quentes.

Desenvolve-se melhor em solos profundos, férteis, bem drenados e areias argilosas, mas suporta e cresce nos solos pouco profundo, salinos, alcalinos, não se desenvolvendo bem nos muito ácidos.

Vive com calor e secura ambiental, mas necessita de alguma humidade no solo e bastante sol, não tolerando a sombra (Henderson, 1991, Time Life Plant Encyclopedia Virtual Garden, 1999).

Desenvolve-se até 1800 m de altitude, como junto dos Himalaias, suportando temperaturas negativas, até cerca de -5°C, e temperaturas positivas até cerca de 38°C.

Ocorrência

A espécie ocorre naturalmente desde a Ásia temperada, à tropical e Austrália, isto é, das faldas dos Himalaias até ao nível do mar, da Índia, China e Austrália tropical.

Encontra-se introduzida, e muitas vezes naturalizada, por vezes infestante, em muitas regiões tropicais, subtropicais e temperadas quentes, como ornamental, árvore de arruamento, sombra de diversas culturas economicamente importantes, como a de cafeeiro.

Em Cabo Verde é encontrada em quintais, junto das habitações e nas povoações e algumas vezes é subespontânea. Encontra-se nas Ilhas de Santo Antão, São Vicente, São Nicolau, Sal, Boavista, Santiago, Fogo e Brava. (Gonçalves, 2002).

Nomes vulgares portugueses

Amargoseira, conteira, mélia, mélia-do-himalaia.

Nomes vulgares cabo-verdianos

Intendente (Santo Antão, São Vicente, São Nicolau e Fogo) ou Tendente (Santiago e Fogo) ou Tindint e Viúva (Santo Antão).

Propriedades e usos mais frequentes

M. azedarach apresenta uma ampla utilização popular, tem vários princípios ativos isolados e várias propriedades farmacológicas testadas e devidamente comprovadas. Entre estas ações destacam-se a atividade antiviral, antimicrobiana, antimalárica, antiparasitária, inseticida, contraceptiva e citotóxica (Tabela 2).

Os extratos de folhas e de sementes contêm vários compostos ativos, dos quais, azadiractina, salanina, meliantriol e nimbim são os principais e possuem comprovada ação inseticida (Vishnukanta, 2008).

Tabela 2 - Propriedades biocidas apresentadas por diferentes partes de *M. azedarach*.

ATIVIDADE	ORGÃOS	REFERÊNCIAS
Antihelmíntico	Folhas e sementes	Yamasaki <i>et al.</i> , 1998
	Frutos	Matias <i>et al.</i> , 2002
Antimicrobiano	Folhas, Caule e Raiz	Khan <i>et al.</i> , 2001
Antipirético, tratamento de eczemas e asma	Frutos	Oelrichs <i>et al.</i> , 1983
Inseticida	Folhas, Frutos e sementes	Srivastava <i>et al.</i> , 1985 Yamasaki <i>et al.</i> , 1988; Huang <i>et al.</i> , 1995; Cabral <i>et al.</i> , 2000; Dantas <i>et al.</i> , 2000; Matias <i>et al.</i> , 2002; Carpinella <i>et al.</i> , 2002 Padrón <i>et al.</i> , 2003; Nathan <i>et al.</i> , 2006; Coria <i>et al.</i> , 2007; Simões <i>et al.</i> , 2007; Carpinella <i>et al.</i> , 2002 e 2007; Ikram <i>et al.</i> , 2012; McKenna, 2013
		Carpinella <i>et al.</i> , 1999
Fungicida	Frutos	Kahn <i>et al.</i> , 2001
Bactericida	Folhas	Khan <i>et al.</i> , 2008

Segundo Matias *et al.* (2002) várias classes de metabolitos estão presentes nos órgãos de *M. azedarach*, nomeadamente, triterpenóides e esteróides, alcalóides, proteínas, fenóis, fitoesteróis e limonóides (Tabela 3).

Tabela 3 - Metabolitos presentes em *Melia azedarach* com atividade biológica descrita.

Metabolitos	Órgão da planta	Atividade biológica	Compostos ativos
Azedarachol	Raiz	Inseticida	Esteróide
Melianol	Fruto	Antihelmíntico	Triterpeno
Meliantriol	Fruto	Antihelmíntico	Triterpeno
Cinamol	Sementes	Repelente	Triterpeno
Campesterol	Sementes	Repelente	Fitoesterol

(Adaptado de Matias *et al.*, 2002)**I.7.3. *Azadirachta indica*****Família:** MELIACEAE**Género:** *Azadirachta* A. Juss.**Espécie:** *Azadirachta indica* A. Juss. (Figura10)**Figura 10** - *Azadirachta indica*
(fotografia da autora).**Caracteres morfológicos**

Árvore pequena ou médio porte, até 15-20 m de altura, perenifólia; tronco retilíneo, de ritidoma cinzento-escuro, fissurado; copa arredondada e densa.

Folhas alternas compostas, imparifoliadas, posicionadas na parte final dos ramos, até cerca de 36 cm de comprimento; pecíolo com 2 pares de glândulas na base; folíolos 8-18, opostos ou subopostos, de peciólulo muito curto e espessado na base, limbo até cerca de 10 x 3 cm, ovado-lanceolado ou lanceolado-falciforme, ápice longamente acuminado, margem grosseiramente serrada, base assimetricamente truncada a acunheada, verde-escuro na página superior, verde-claro na inferior, glabro.

Flores odoríferas, poligâmicas (bissexuadas e masculinas no mesmo indivíduo), reunidas em numerosas panículas, axilares, mais curtas que as folhas; pedicelos muito delgados; cálice curto, com 5 lobos subcirculares; corola de 5 pétalas livres, com cerca

de 5 mm de comprimento, espatuladas, margem glandulosa, brancas; estames 10, com os filetes unidos num tubo estaminal um pouco mais curto que as pétalas, lobado no ápice, creme-pálido; ovário súpero, com 3 lóculos, estilete mais curto que o tubo estaminal, estigma capitado com 3 lóbulos.

Fruto drupáceo, até 2 cm de comprimento, elipsoidal, verde-amarelado de início, tornando-se avermelhado na maturação.

Carateres ecológicos

Espécie que cresce numa grande amplitude de condições, relativamente ao solo e temperatura.

Desenvolve-se melhor em áreas de clima tropical e subtropical, com solos profundos, arenosos, bem drenados, neutros ou levemente ácidos, e grande exposição à luz solar, mas tolera alguma amplitude destas condições.

Vive bem até 700 m de altitude, contudo desenvolve-se até 1500m.

Tem excelente tolerância à seca e temperaturas altas, mas não suporta solos encharcados, sombra prolongada e temperaturas abaixo de 4°C.

Ocorrência

Não existe a certeza quanto à origem de *A. indica*, mas crê-se ser nativa da região asiática, Assam (Índia) - Bangladeche – Myanmar.

Atualmente encontra-se largamente cultivada e naturalizada em todas as regiões tropicais e subtropicais, como ornamental, árvore de sombra, controladora da erosão, produtora de madeira para construção, mobiliário e carvão e para fins medicinais.

Nomes vulgares

Amargosa, nem ou nim.

Propriedades e usos mais frequentes

A. indica é muito conhecida e cultivada na Índia devido as suas propriedades medicinais, sendo utilizada há mais de 4000 anos (Gurpreet *et al.*, 2004). A sua aplicação tem sido extensiva às mais diversas áreas: medicina, cosmética, controlo de

pragas agrícolas e, mais recentemente, têm sido avaliados os seus efeitos em insetos vetores de agentes patogénicos (Dua *et al.*, 2009).

Apresenta atividade em mais de 200 espécies de organismos, sendo várias espécies de lepidópteros, coleópteros homópteros, dípteros e heterópteros (Martinez, 2002). Existe referências à ação antifágica, reguladora de crescimento e esterilizante em nematóides, fungos, bactérias e alguns fitovírus, (Tabela 4), (Singh, 1996; Souza, 2002; Schmutterer, 1988).

Tabela 4 - Propriedades medicinais e atividades biológicas apresentadas por diferentes partes de *A. indica*.

ATIVIDADE	ORGÃOS	REFERÊNCIAS
Anti-helmíntico	Diferentes órgãos	Costa, 2004
Antimicrobiano	Folhas	Shravan <i>et al</i> , 2011
Antioxidante	Folhas e Flores	Sithisarn <i>et al</i> , 2005
Anti VIH/SIDA	Folhas	Mbath <i>et al</i> , 2007
Antimalárica	Casca e Folhas	Isah <i>et al.</i> , 2003
Inseticida	Folhas, Frutos, Sementes e Casca	Gratz <i>et al.</i> ,1989; Nathan <i>et al.</i> , 2005 Okumu <i>et al.</i> , 2007; Howard <i>et al.</i> , 2009; Aremu <i>et al.</i> , 2009;Caser <i>et al.</i> , Knols, 2010; Ndionel <i>et al.</i> , 2013
Fungicida	Folhas	Khajista <i>et al.</i> , 2013
Bactericida	Folhas	Banerjee <i>et al.</i> , 2013

I.7.4. *Mentha pulegium*

Família: LAMIACEAE

Género: *Mentha* L.

Espécie: *Mentha pulegium* L. (Figura 11)



Figura11 - *Mentha pulegium*
(fotografia da autora).

Carateres morfológicos

Planta herbácea vivaz, fortemente aromática, com estolhos enraizando nos nós, caules prostrados a eretos, de secção quadrangular, por vezes avermelhados, mais ou menos estriados pilosos.

Folhas oposto-cruzadas, pecíolo curto até 6 mm, limbo até cerca de 6 x 3 cm, ovado a elítico, elítico-oblongo a obovado, ápice obtuso a arredondado, margem inteira ou com cerca de 6 pares de dentes curtos, base arredondada, puberulento, 3-4 pares de nervuras bem evidentes.

Flores numerosas, dispostas em inflorescências compostas de verticilastros axilares, subtendidos por brácteas foliáceas; cálice bilabiado, 5-dentado, hirsuto e conspicuamente nervado; corola fracamente bilabiada, pilosa, 4-lobada, lilacínea; Estames inseridos sobre o tubo da corola, quase iguais, exsertos; ovário súpero, 4-loculado, estilete exserto, estigma bifido.

Fruto formado de 4 mericarpos.

Carateres ecológicos

M. pulegium requer, para viver, locais húmidos ou ocasionalmente inundados, valas, charcos, lagoas, margens de cursos de água, represas ou açudes, todos os locais de condições semelhantes de climas temperados ou temperados quentes. Embora se desenvolva em solos arenosos, argilosos e pesados, com pH variável, de ácidos, neutros a alcalinos, soalheiros ou em semi-sombra, apresenta preferência por solos ácidos com humidade permanente ou temporária.

Ocorrência

Espécie natural de quase toda a Europa (excetuam-se algumas regiões no norte), Norte de África, toda a Macaronésia e Sudoeste da Ásia.

Em Portugal tem ocorrência natural.

Atualmente encontra-se largamente cultivada e naturalizada em todas as regiões temperadas e subtropicais.

Nomes vulgares portugueses

Poejos, poejo, hortelã pimenta mansa, hortelã dos açores.

Nomes vulgares cabo-verdianos

Vergamota (Santo Antão).

Propriedades e usos mais frequentes

O OE da planta aromática *M. pulegium* tem na sua constituição principalmente: a pulegona, a mentona, a isomentona e a piperitona (Monteiro *et al.*, 2007) entre outras cetonas e o limoneno. Os órgãos aéreos, vegetativos e reprodutivos encontram-se cobertos por indumento que inclui tricomas glandulares e não glandulares. Os OEs são produzidos nos tricomas glandulares (Monteiro *et al.*, 2007).

Mentha pulegium, vulgarmente conhecido como poejo, é um condimento emblemático da gastronomia do Alentejo (Póvoa, 2008), sendo também particularmente apreciada em Trás-os-Montes (Carvalho, 2010). É muito popular em Portugal devido ao famoso licor preparado com as inflorescências, o licor de poejo. O uso tradicional desta espécie centra-se em usos alimentares e na medicina tradicional. Nesta é usada a infusão das partes aéreas para combater constipações, gripes, tosse, facilitar a digestão, cólicas gastrointestinais e abrir o apetite.

O seu cultivo destina-se, essencialmente, a fins industriais, para extração do seu óleo usado em aromaterapia, saboaria, inseticidas e obtenção de mentol.

A Tabela 5 apresenta referências de alguns estudos de atividade de óleos essenciais e extratos de diferentes órgãos desta planta quer na medicina tradicional, quer como fungicida, bactericida e inseticida.

Tabela 5 - Propriedades medicinais e atividade biológica de *M. pulegium*.

Propriedades medicinais e atividade biológica	Referências
Antisséptico, Tratamento de problemas respiratórios, Tuberculose e da cólera	Zargari, 1990
Antiflatulento, carminativo, expetorante, diurético, antitússico, emenagogo	Carvalho, 2010; Newall <i>et al.</i> , 1996
Antiespasmódico, sedativo, estimulante, febrífugo, antihelmíntico, facilitador do parto, antidiséptico	Monteiro <i>et al.</i> , 2007, Manez <i>et al.</i> , 2008
Tratamento de doença digestivas, da vesícula e dos rins	Gruenwald <i>et al.</i> , 1998
Citotóxico	Shirazi <i>et al.</i> , 2004
Antioxidante	El-Ghorab, 2006, Mata <i>et al.</i> , 2007
Antimicrobiano	Mahboubi & Haghi, 2008, Jazani <i>et al.</i> , 2009
Fungicida, inseticida	Choi <i>et al.</i> , 2003 Pavlidou <i>et al.</i> , 2004; Conceição, 2008; Pavela, 2008; Kumar <i>et al.</i> , 2011; Benayad <i>et al.</i> , 2012
Acaricida	Rim & Jee, 2006; Veeraphant <i>et al.</i> , 2011

I.7.5. *Foeniculum vulgare*Família: **APIACEAE**Género: ***Foeniculum*** Mill.Espécie: ***Foeniculum vulgare*** Mill. (**Figura 12**)**Figura 12** - *Foeniculum vulgare* (fotografia da autora).

Carateres morfológicos

Planta herbácea rizomatosa bienal ou perene, perenifólia, atingindo 2,5 m de altura; rizoma esbranquiçado, armazenando muita água; caules eretos, estriados, tornando-se rígidos, ramificados na metade superior, glabros, verdes a glaucos.

Folhas alternas, 3-4-partidas, as basilares até 43 x 35 cm, as caulinares progressivamente mais curtas e menos divididas, as superiores reduzidas a um pequeno apêndice; pecíolo de base dilatada e invaginante, de comprimento maior nas folhas superiores; segmentos filiformes e muito flexíveis, gradualmente menores.

Flores 2 a 5 mm de diâmetro, numerosas, dispostas em umbelas compostas terminais e laterais; cálice nulo; corola de 5 pétalas livres, amarelo-vivo; estames 5, de filetes espessados na base; ovário ínfero, 2-loculado.

Fruto formado de 2 mericarpos ligados a um eixo central resultante da base dos estames, ovoides, comprimidos e fortemente 5-sulcados.

Carateres ecológicos

F. vulgare é exigente relativamente às condições ecológicas para crescer e desenvolver-se.

Requer climas suaves, temperado-quentes, locais ensolarados com solos alcalinos, com pH entre 6,3 e 8,3, e que sejam bem drenados.

Planta sobrevive em regiões de dia menos longo, mas só ocorre a frutificação em regiões de dias longos, com época de mais de 13,5 horas / dia.

Quando é feita a cultura em zonas de climas mais quentes, necessita que aquela seja feita em zonas de altitude, para que ocorram as condições climáticas de zonas temperadas para poder crescer e desenvolver-se (Purwaningsih *et al.*, 1999).

Ocorrência

Planta nativa da região Mediterrânea, estendendo-se à Madeira e Canárias, e Ásia ocidental.

Ocorre cultivado ou naturalizado em Cabo verde, África do Sul, em quase toda a Europa, América do Norte, Central e do Sul, Ilhas do Pacífico e Austrália.

Encontra-se vulgarmente nas margens dos campos e caminhos, sebes, lugares secos e rochosos.

Atualmente é cultivado, com diversas variedades hortícolas, em todas as regiões temperadas e subtropicais.

Plantas aromáticas e medicinais, pertencentes à família das umbelíferas, de origem mediterrânea, eram cultivadas pelos egípcios como alimento, condimento, bebida e medicamento desde 1500 a. C. e na antiga Grécia e Roma (Tognolini *et al*, 2007; Purwaningsih *et al.*, 1999; Tinoco *et al.*, 2007).

Nomes vulgares portugueses

Fiôlho, funcho, funcho amargo, funcho bravo.

Nomes Vulgares cabo-verdianos

Vergamota (Santo Antão), erba doce, funcho, funcho gomado (Santiago).

Propriedades e usos frequentes

F. vulgare é fortemente aromática, comestível e medicinal, utilizada tradicionalmente em medicina, culinária (onde é aproveitada toda a planta) e bebidas espirituosas e aromatizante. Atualmente é usada numa vasta gama de indústrias alimentar, farmacêutica, perfumaria, cosmética e saboaria (Purwaningsih *et al.*, 1999; Tinoco *et al.*, 2007).

Para além destas utilizações, apresenta vasta atividade biológica (Tabela 6).

O cheiro e sabor característicos dos mericarpos (em geral designados por "anis" ou "erva-doce") resultam da presença de anetol, um composto fortemente aromatizante.

A descrição das espécies vegetais em estudo e sua importância foram apoiados na seguinte bibliografia comum, que se encontra integrada no VI Capítulo das referências bibliográficas, (endereços “on line” consultadas na Internet numeradas de 6 à 16, bem como outras referências Franco, 1971; Franco, 1972; Rocha, 1996; Ahmed *et al*, 1997; Ahmed *et al.*, 1997; Purwaningsih, *et al.*, 1999; Salgueiro, 2005; Lillo, 2007; Proença da Cunha *et al.*, 2007; Mabberley, 2008).

Tabela 6 - Propriedades biocidas apresentadas por diferentes partes de *F. vulgare*.

ATIVIDADE	ORGÃOS	REFERÊNCIAS
Antihelmíntico	Frutos	Kumar <i>et al.</i> , 2012
Antimicrobiano	Folhas e frutos	Tinoco <i>et al.</i> , 2007
Carminativo, Digestivo, Diurético e Lactagogue	Folhas, Caules e Frutos	Reynolds, 1982; Kowalchick <i>et al.</i> , 1988; Marotti <i>et al.</i> , 1993; Marotti <i>et al.</i> , 1994; Parejo <i>et al.</i> , 2004
Inseticida Acaricida	Folhas, Frutos e sementes	Chantraine <i>et al.</i> , 1998; Kim <i>et al.</i> , 2001; Mimica-Dukić <i>et al.</i> , 2003; Cheng <i>et al.</i> , 2004; Traboulsi <i>et al.</i> , 2005; Lee <i>et al.</i> , 2006 Conti <i>et al.</i> , 2010; Zoubiri <i>et al.</i> , 2011
Fungicida	Sementes e Frutos	Mimica-Dukić <i>et al.</i> , 2003; Ozcan <i>et al.</i> , 2006; Singh <i>et al.</i> , 2006 Soylu <i>et al.</i> , 2007 e Park <i>et al.</i> , 2010
Bactericida	Frutos	Araque <i>et al.</i> , 2007; El-Adly <i>et al.</i> , 2007

I.8. Caracterização dos Óleos Essenciais (OEs) das plantas aromáticas e medicinais em estudo (*M. pulegium* e *F. vulgare*) e vias Biossintéticas

Os OEs são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídos na maioria das vezes, por moléculas de natureza terpénica (Simões *et al.*, 2004). Frequentemente apresentam odor agradável e intenso. Maior parte das vezes são extraídos das partes vegetais através de arraste do vapor de água, hidrodestilação ou expressão de pericarpo de frutos cítricos, porém há outros métodos de extração como a “enfleurage” ou enfloração, extração por

CO₂ supercrítico (muito utilizado na indústria) e por solventes orgânicos apolares (não apresentam valor comercial).

Os OEs de plantas compreendem classes de compostos de origens biossintéticas distintas. Distinguem-se assim os constituintes terpenóides dos fenilpropanóides, com base na proveniência destes. Embora os terpenóides sejam os constituintes maioritários e mais frequentes dos OEs de uma grande variedade de plantas, quando presentes, os fenilpropanóides contribuem de forma significativa para o carácter aromático de alguns OEs, sendo assim indispensáveis (Sangwan *et al.*, 2001). Quanto a biogénese terpenóides e fenilpropanóides resultam de vias e precursores metabólicos distintos e são gerados por vias biossintéticas completamente distintas (Sangwan *et al.* 2001).

Os terpenóides constituem uma vasta família de produtos naturais, cujas estruturas contêm um esqueleto carbonado composto de várias unidades de isopreno (2-metilbutadieno. Contudo, o isopreno não está envolvido na biossíntese destes compostos, também designados por isoprenóides, os quais são formados a partir de duas unidades em C₅ o 3,3`-dimetilalil pirofosfato (DMAP) e o 3-isopentenil pirofosfato (IPP) (Lobo *et al.*, 2007).

Atualmente são conhecidas duas vias biossintéticas responsáveis pela formação do IPP e do DMAP. A via clássica do Mevalonato (MVA) ocorre predominantemente no citoplasma e mitocôndrias resultando na formação de esteróides, sesquiterpenos, ubiquinonas e outras (Lichtenthaler, 1997). Esta via caracteriza-se pela condensação sequencial de três moléculas de acetil-CoA originando uma molécula de HMG-CoA (hidroximetil glutaril CoA) convertida para uma molécula de MVA pela acção da HMG-CoA reductase. Posteriormente, o MVA (com seis átomos de carbono) sofre duas fosforilações e uma descarboxilação resultando finalmente no IPP (Lichtenthaler, 1997). Além desta via, foi descoberta mais recentemente, em plantas, algas e bactérias, uma outra via de biossíntese de IPP independente de MVA. Esta “nova” via designada de DXP (desoxixilulose fosfato) ocorre predominantemente nos plastos e está associada a

formação de hemi-terpenos, monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos (Eisenreich *et al.*, 2001). Nesta via, verifica-se a formação de um intermediário com cinco átomos de carbono, o D-1-desoxixilulose-5-fosfato (DXP), em vez do MVA, a partir de dois precursores, o piruvato e o gliceraldeído-3-fosfato (GAP) (Lichtenthaler, 1997).

O processo de biossíntese dos terpenóides é mediado por várias enzimas. As prenil transferases participam nas reações de condensação do tipo “cauda cabeça” entre as moléculas dadoras do grupo prenil e o novo IPP, sendo responsáveis pela formação de geranyl pirofosfato (GPP), precursora dos monoterpenos. A condensação desta cadeia em C₁₀, com novas unidades de IPP origina sucessivamente as cadeias de farnesil pirofosfato (C₁₅), geranylgeranyl pirofosfato (C₂₀) e geranylarnesil pirofosfato (C₂₅), precursoras dos sesquiterpenos, diterpenos e sesterterpenos, respetivamente. Por outro lado, a condensação de duas cadeias de farnesil pirofosfato, e a de duas cadeias de geranylgeranyl pirofosfato, formam cadeias de 30 e 40 carbonos, precursoras dos triterpenos e dos tetraterpenos (carotenóides), respectivamente (Lobo *et al.*, 2007).

Foram já identificadas mais de vinte ciclases intervenientes nas reações intramoleculares entre átomos de carbono, o que permite compreender a enorme diversidade de compostos terpenóides que é possível encontrar na natureza (Charlwood e Bantorpe, 1991).

A biossíntese de isoprenóides está relacionada com três compartimentos celulares, o citosol, a matriz mitocondrial e o estroma dos plastídios. O retículo endoplasmático é o sistema de membranas que participa da biossíntese dos terpenos em cooperação com o citosol. No caso da matriz mitocondrial e do estroma dos plastídios, é o sistema de membranas internas desses organelos que participa da cooperação na biossíntese (Kleing, 1989).

A designação de fenilpropanóides aplica-se a um vasto grupo de compostos naturais muito distintos. O metabolismo deste grupo de compostos subdivide-se em muitas via metabólicas dando origem a milhares de compostos, alguns deles específicos de determinadas espécies (Weisshaar e Jenkins, 1998). Um dos mais importantes ramos metabólicos leva a produção de flavonóides, antocianinas e taninos (Weisshaar e

Jenkins, 1998). A via principal, a partir da qual são originados os fenilpropanóides, designa-se por via do chiquimato. Esta via representa a via de biossíntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) que ocorre unicamente em microrganismos e plantas.

A composição química dos OEs é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem causar alterações significativas na produção dos metabolitos secundários. De fato, os metabolitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente. Os estímulos decorrentes do ambiente, no qual a planta se encontra, podem redirecionar a via metabólica, conduzindo a biossíntese de diferentes compostos. Entre estes fatores destacam-se: as interações planta/ microrganismos, planta/ insetos e planta/ planta; a idade e estágio de desenvolvimento, fatores abióticos como luminosidade, temperatura, pluviosidade, nutrição, época e horário de colheita, bem como técnicas de colheita e pós-colheita. É válido salientar que estes fatores podem apresentar correlações entre si, não atuando isoladamente, podendo exercer influência conjunta no metabolismo secundário.

I.9. Acumulação de OE e sua localização em órgãos

Os voláteis dos OEs são sintetizados, armazenados e libertados para o ambiente por uma variedade de estruturas existentes na epiderme e no mesófilo de plantas (Sangwan *et al.*, 2001). Dependendo da família, os óleos essenciais cujos constituintes são na sua maioria terpenos podem ser encontrados em estruturas secretoras especializadas, tais como em tricomas glandulares, células parenquimatosas diferenciadas, ductos secretores ou células secretoras e podem estar armazenados em órgãos como folhas, caules, raízes, inflorescências e frutos. Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos, sua composição pode variar segundo a localização.

As espécies de Apiaceae são caracterizadas pela presença de ductos secretores de OE localizados em diversos órgãos das plantas (frutos, caules, folhas, pecíolos, entre outros). No caso do funcho, verifica-se, que podem existir ductos no parênquima

medular, na proximidade dos tecidos vasculares e ainda ductos de maior calibre entre o floema e os feixos de fibras do esclerênquima (Sousa *et al.*, 2005).

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

O presente trabalho engloba um conjunto de ações, nomeadamente a colheita e processamento de plantas e o rastreio sobre alvos biológicos, dos extratos vegetais e óleos essenciais obtidos, através do qual se pretende:

- Caracterizar o perfil químico dos extratos de *Sambucus nigra* L., *Melia azedarach* L. e *Azadirachta indica* Juss e óleos essenciais das espécies *Mentha pulegium* Linnaeus e *Foeniculum vulgare* Mill., de ilhas de Cabo Verde e de Portugal, as quais foram seleccionadas a partir de estudos preliminares (Rocha *et al*, 2007; Matos *et al.*, 2009);
- Avaliar o efeito inseticida de produtos destas plantas em formas imaturas e adultas de *Anopheles arabiensis*, único vetor de malária em Cabo Verde, e de *Aedes aegypti*, principal vetor de febre-amarela e dengue, usando os protocolos da Organização Mundial de Saúde (OMS) para efetuar os testes de sensibilidade.
- Avaliar a sensibilidade de populações de *Ae. aegypti* e *An. arabiensis* de Cabo Verde a alguns inseticidas químicos, utilizados no programa de luta anti-vetorial local;

Estes objectivos gerais foram atingidos através de implementação de um conjunto de procedimentos que consubstanciam os seguintes objectivos específicos:

- i) Extração e caracterização dos fitoquímicos das plantas de Cabo Verde e de Portugal;
- ii) Avaliação das propriedades dos bio compostos através de testes de sensibilidade de OMS, (mosquitos imaturos e adultos mantidos em laboratório);
- iii) Determinação dos parâmetros de letalidade (CL₅₀ e CL₉₀) dos bio compostos mais eficazes para mosquitos capturados no terreno;
- iv) Comparação da toxicidade das plantas: *Sambucus nigra*, *Melia azedarach*, *Azadirachta indica*, *Mentha pulegium* e *Foeniculum vulgare*, nas duas espécies de mosquitos.
- v) Avaliação da sensibilidade de populações de *Ae. aegypti* e *An. arabiensis* de Cabo Verde a alguns inseticidas químicos utilizados no programa de luta anti vetorial local;

Em relação a este último objetivo não foi possível a sua execução devido a limitação do tempo e a morosidade do processo de implementação e produção da colónia de *An. arabiensis*.

Com este estudo pretendeu-se aprofundar conhecimentos técnico-científicos na área dos bio-inseticidas, com avaliação de sensibilidade de populações de mosquitos vetores de agentes patogénicos a um conjunto de plantas autóctones, quantificação de parâmetros de letalidade dos extratos, óleos essenciais e constituintes ativos maioritários das mesmas. Espera-se que tais conhecimentos possam servir de base, à futuros trabalhos complementares a elaboração de formulações inseticidas e/ou repelentes, importante ferramenta na proteção integrada direcionada aos insetos vetores.

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

III.1. Caracterização geográfica e edafoclimáticas do Arquipélago de Cabo Verde

A República de Cabo Verde é um país insular africano e um arquipélago de origem vulcânica constituído por dez ilhas, situado no Oceano Atlântico, cerca de 640 km a oeste do Senegal, entre 14° 13' e 17° 47' de latitude Norte e 22° 45' e 26° 22' longitude Oeste (Figura13).



Figura 13 - Mapa de Cabo Verde, adaptado (8).

O arquipélago de Cabo Verde está localizado na zona sub-saheliana, apresentando um clima árido ou semiárido. O oceano e os ventos alíseos moderam a temperatura. A média anual raramente é superior a 25 °C e não desce abaixo dos 20 °C. A temperatura da água do mar varia entre 21 °C em Fevereiro e 25 °C em Setembro. As estações do ano são fundamentalmente duas: "as-águas" e "as-secas" ou "tempo das brisas".

Em Cabo Verde, a dinâmica dos fatores climáticos e meteorológicos dominantes não favorecem a ocorrência de pluviosidade. As precipitações ocorrem principalmente entre Agosto e Setembro (60 % a 80 %), sendo que a quantidade de chuva é variável entre as ilhas em função da prevalência de fatores favoráveis à sua ocorrência, combinados com a topografia e a altitude. As ilhas montanhosas são as mais chuvosas, com destaque para

Fogo (495 mm), Santiago (321 mm), Brava (268 mm) e Santo Antão (237 mm). As ilhas do Sal e Boavista apresentam valores médios anuais mínimos de precipitação (60 mm e 68 mm) enquanto as restantes ilhas apresentam valores intermédios: 93 mm em São Vicente, 142 mm em São Nicolau e 150 mm na ilha de Maio. Não existem rios permanentes, o regime fluvial é torrencial e associado ao relevo acidentado, provoca correntes rápidas, com caudais de ponta significativos, que preenchem cursos de água efémeros (Moreno, 2013).

Os solos formaram-se a partir de rochas vulcânicas tais como os basaltos, fotolitos, tufos, escórias, traquitos, andesites e rochas sedimentares, principalmente calcárias. São, na sua grande maioria, esqueléticos e pobres em matéria orgânica.

Apenas 10% do solo é potencialmente arável; destes, 95% vêm sendo ocupados por agricultura de sequeiro e os restantes 5% por agricultura de regadio. Estes terrenos estão, na sua maior proporção, localizados em zonas semiáridas e áridas, onde a pressão dos fatores climáticos adversos se manifesta com maior intensidade, dificultando assim o estabelecimento do coberto vegetal, indispensável à produção agrícola (9).

II.2. Material vegetal

III.2.1. Colheita das plantas

O material vegetal utilizado para todas as fases experimentais foi proveniente do campo, do espaço onde cresce e se desenvolve atualmente, respetivamente das regiões do Norte e Sul de Portugal e Arquipélago de Cabo Verde (ilhas de Santiago e Santo Antão), sendo todas as amostras recolhidas na mesma fase de desenvolvimento da planta.

O trabalho de campo teve início com a colheita de folhas de *Melia azedarach* e *Azadirachta indica* na ilha de Santiago, na região Santiago Norte. Embora a ação inseticida de *A. indica* já estar bastante estudada, considerámos importante a sua inclusão neste estudo devido à sua abundância nas ilhas de Cabo Verde e por nunca ter sido testado qualquer material proveniente desta região geográfica.

As folhas de *M. azedarach* e de *A. indica* foram retiradas das plantas no local, em diferentes épocas do ano: Agosto (época da chuva) e Dezembro (época seca) e foram transportadas para Lisboa devidamente acondicionadas em Outubro e Dezembro de 2010, datas a partir das quais se deu início ao processo de extração.

As folhas verdes de *Sambucus nigra* foram colhidas em Junho de 2011 em Vieira do Minho, Distrito de Braga. Esta planta é a única que não pertence à flora do arquipélago de Cabo Verde, tendo sido incluída no estudo dada a sua atividade larvívora, constatada em ensaios preliminares e com resultados bastante promissores (Rocha *et al.*, 2008).

A parte aérea de *Foeniculum vulgare* e as folhas verdes de *Mentha pulegium* foram colhidas na ilha de Santo Antão em Cabo Verde, na localidade do Porto Novo, no viveiro florestal de Cova, no mês de Agosto de 2011. A segunda espécie foi também colhida na Pedreira das Flores, Évora, em Janeiro de 2012. A segunda fase de colheita de *M. azedarach* também foi feita em Agosto de 2011 na ilha de Santiago.

III.2.2. Identificação das plantas e preparação de exemplares para herbário

Sob a orientação científica da Doutora Maria Cândida Liberato, Investigadora Principal, aposentada do Instituto de Investigação Científica Tropical (IICT), as espécies vegetais em estudo foram identificadas com base em espécimes retirados de todas as amostras coletadas em Cabo Verde e Portugal.

Herborizaram-se exemplares e etiquetaram-se referenciando-se o coletor, número, local e data de colheita, de modo a serem depositados no Herbário do IICT (LISC) em Lisboa e desta forma assegurar a sua conservação, validar os espécimes e a origem geográfica das plantas em estudo.

Os espécimes foram identificados através da análise dos caracteres morfológicos externos, com o auxílio de lupa ocular quando necessário, com base em bibliografia de referência apropriada e comparação com materiais adequados.

III.3. Processamento do material vegetal

Na bibliografia é referido que todos os órgãos das plantas podem ser utilizados para extração de óleos essenciais mas, para melhor gestão de tempo, optámos por trabalhar apenas as folhas, com a exceção de *Foeniculum vulgare* e da *Mentha pulegium*, em que foi necessário incluir toda a parte aérea devido ao baixo rendimento destas plantas no processo de extração.

Todos os trabalhos de secagem, produção de óleos e extratos vegetais decorreram no laboratório de Ecofisiologia e Biotecnologia (URGENP) do INIAV, em Oeiras.

III.3.1. Obtenção de extratos vegetais

A preparação dos extratos desenvolveu-se em 4 fases: secagem, extração, filtração e evaporação (Figura 14).



Figura 14 - As diferentes etapas da preparação do extrato (fotografia da autora).

A extração é um dos processos mais utilizados para o isolamento de compostos ativos presentes nas plantas medicinais (Marcano, 1991). Existem vários tipos de extração, que variam de acordo com a natureza da substância a ser extraída. Os fatores que interferem neste processo dependem de características inerentes ao próprio material vegetal, do tipo de solvente e da complexidade da mistura obtida, do grau de afinidade do solvente para os diferentes constituintes, e da metodologia utilizada, ou seja se o processo decorre a

quente, por “Soxhlet” ou fervura, ou a frio, por simples contacto ou por agitação ou centrifugação, consoante a forma de extração mais indicada para cada caso (10). Pode ainda efetuar-se a extração com um único solvente ou utilizar um gradiente de solventes de polaridade crescente, aproveitando a afinidade de cada solvente para os vários constituintes da planta em análise, providenciando através de extração fracionada a obtenção de misturas menos complexas e que permitam mais facilmente a identificação dos constituintes bioativos presentes em cada um dos extratos orgânicos assim obtidos.

No que respeita às características inerentes ao próprio material vegetal, o seu grau de divisão interfere com a eficiência da extração, ou seja se estamos perante uma estrutura física bem compactada, como nos caules e raízes, o solvente terá maior dificuldade em penetrar e atacar o conteúdo celular da planta, daí a vantagem de as estruturas vegetais serem submetidas a moagem fina, enquanto que no caso das folhas e flores, órgãos que apresentam estrutura mais frágil, não é necessária uma moagem muito fina.

Em análises fitoquímicas, quando em presença de plantas de elevada complexidade química ou quando se desconhece completamente o conteúdo do material a analisar, deve proceder-se à extração fracionada com diferentes solventes, conforme referido acima.

Na escolha de um solvente, além dos fatores relacionados com a eficiência do processo de extração, deve ainda ser considerada a toxicidade e os riscos inerentes à sua manipulação, a estabilidade das substâncias nele solubilizadas, a disponibilidade e custo do solvente.

Fatores como a agitação, a temperatura e o tempo de duração do processo condicionam a eficácia da extração. A agitação pode reduzir período de extração, se tivermos em consideração que este depende de fenómenos de difusão e que a renovação do contato do solvente com as substâncias a dissolver influencia a velocidade da difusão.

III.3.1.1 Secagem do material vegetal e produção de extratos

Após a determinação da massa total fresca das folhas numa balança “Mettler”® estas foram distribuídas em vários tabuleiros e colocadas num compartimento às escuras com arejamento e à temperatura máxima de 35° C, durante cerca de 8 dias para secagem. Findo este período, avaliou-se o peso seco das folhas e procedeu-se em seguida à sua “moagem” num moinho “Moulinex”®, modelo 327, de forma a efetuar o cálculo de rendimento do peso seco.

O extrato etanólico de *M. azedarach* foi obtido a partir de 200g de folhas secas grosseiramente moídas, que se adicionou 1,5 L de etanol (EtOH) p.a. num Erlenmayer de 2 litros. Após agitação manual, com movimentos circulares, para garantir que todo o material vegetal ficava submerso no solvente, este foi colocado num agitador magnético “Giratory Shaker - Modelo G2®, New Brunswick, USA”. O Erlenmayer foi devidamente tapado com papel de alumínio e parafilme de modo a evitar a evaporação do solvente e mantido em agitação, 50 rotações por minuto (rpm), durante 48 horas. O extrato em hexano de *M. azedarach* foi obtido também a partir de 200g de folhas secas e moídas, a que se adicionaram 1,5 L de n-hexano (n-Hex) num Erlenmayer de 2 litros. A mistura foi colocada num agitador e procedeu-se nas mesmas condições descritas para o extrato em etanol.

Todo o material de vidro utilizado na evaporação foi previamente lavado 2 vezes com acetona de modo a eliminar eventuais resíduos contaminantes e colocados durante alguns minutos numa estufa a 40 °C para eliminação da acetona de lavagem.

O protocolo de extração para as folhas de *S. nigra* e de *A. indica* é o mesmo utilizado para a *M. azedarach* apenas variando a quantidade de material vegetal e os solventes de extração na primeira planta. Assim para a espécie *S. nigra* foram utilizadas 130 g de folhas maceradas em 650 ml de solvente.

III.3.1.2 Filtração e evaporação

Os extratos obtidos foram posteriormente submetidos a um processo de filtração sob vácuo, recorrendo a um funil de Buckner equipado com papel de filtro (Whatman nº 4 com 110mm de diâmetro) acoplado a um Kitasato ligado a uma bomba de vácuo. A fase líquida da extração com cada um dos solventes foi recolhida em balões de evaporação, previamente tarados.

As fases líquidas dos extratos obtidas após filtração foram submetidas a evaporação, com vista à concentração da amostra por eliminação total do solvente de extração. Para tal, os balões de evaporação com os filtrados devidamente identificados foram acoplados a um evaporador rotativo (Rotavapor-R114, Büchi-Waterbath® B-480), sob vácuo, a pressões e temperaturas definidas para cada solvente. O etanol foi evaporado a pressão de 175 mbar a 40°C e o n-hexano a 335 mbar à mesma temperatura. No final do processo de evaporação, os balões foram novamente pesados numa balança de precisão de modo a viabilizar a determinação do rendimento de extração de cada solvente.

III.3.1.3. Análise cromatográfica dos extratos orgânicos

No presente estudo o fracionamento dos diferentes extratos totais obtidos de folhas com os diferentes solventes orgânicos, e o isolamento dos respetivos constituintes, foram realizados por cromatografias sucessivas de Cromatografia em Camada Fina (CCF) e de Coluna de Cromatografia.

A cromatografia é uma técnica analítica, que permite a separação de vários componentes de uma mistura tendo em conta as propriedades de solubilidade, tamanho e massa. Baseia-se nas diferentes velocidades de deslocamento das moléculas através de um meio poroso - fase estacionária - quando arrastadas por um eluente, líquido ou gasoso, em movimento - fase móvel. A separação cromatográfica está relacionada com o fenómeno de adsorção, ou seja com a aderência de partículas, moléculas ou iões, à fase estacionária, que pode ser um papel poroso, sílica gel, alumina, entre outros (Barroso *et al.*, 1991).

A escolha apropriada da fase estacionária e da fase móvel, além de outras variáveis, vai permitir que os componentes da mistura sejam arrastados (eluídos) ordenadamente. Na Cromatografia em Camada Fina (CCF) a fase estacionária absorvente é uma camada de um sólido de espessura uniforme colocada numa placa de material rijo (vidro, plástico ou alumínio).

As análises de CCF (Figura 15) foram realizadas em placas de sílica gel com suporte de alumínio (Merck® 60 F₂₅₄) as quais foram eluídas com os vários sistemas de solventes previamente selecionados. Após a aplicação dos extratos com um capilar em pontos definidos na linha de base das placas, estas foram transferidas para tinas de eluição, previamente saturadas com o sistema de eluentes, havendo o cuidado de não deixar que a mistura atinja o topo da placa. Terminado o desenvolvimento do cromatograma a placa é retirada da tina, marca-se a linha da frente e deixa-se evaporar o solvente. Com este procedimento pretende-se identificar preliminarmente os grupos químicos dos compostos responsáveis por uma eventual bioatividade.

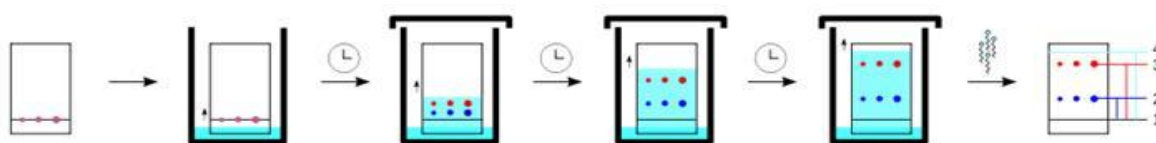


Figura 15 - Ilustração de sequência de uma cromatografia TLC. 1-linha de colocação da amostra; 2- amostra; 3- distância que a amostra deslocou-se ao longo da placa; 4- frente do solvente. (11).

Os extratos foram fracionados numa coluna de sílica com uma gama de solventes de polaridade crescente, previamente destilados. A separação dos compostos, em cada fração, foi realizada através da eluição com uma mistura de solventes previamente selecionada. Para cada extrato vegetal procedeu-se a uma análise cromatográfica preliminar, por CCF, com o objetivo de pré-determinar a melhor combinação de solventes a usar para o fracionamento cromatográfico em coluna.

As análises dos extratos por cromatografia em coluna (CC) foram realizadas através de sílica gel (Merck® 60 Mesh ASTM 70-230), sendo posteriormente efetuada a avaliação da sua ação inseticida (Princípio e Protocolo de CC em Anexo I.1 e I.2).

Assim, uma coluna de cromatografia (80 cm de altura, 4 cm de diâmetro foi cheia até 2/3 com sílica gel (Merck® 60 Mesh ASTM 70-230), no topo da qual foi colocada uma camada de areia inerte (1 cm). A sílica foi compactada com n-hexano mantendo solvente ao nível da base da camada de areia. A amostra de extrato (200 mg), impregnada numa pequena camada de sílica foi aplicada sobre a areia. A eluição foi iniciada com n-hexano a 100% e sendo a polaridade da mistura de solventes gradualmente aumentada com a seguinte sequência: n-hexano (100%), n-hexano/clorofórmio (80-20, 60-40, 40-60%) clorofórmio (100%), clorofórmio/acetato de etilo (80-20, 60-40, 40-60 e 20-80 %) acetato de etilo (100%), acetato de etilo/metanol (80-20, 60-40 e 40-60 %) e metanol 100%. Foram recolhidas alíquotas de 10 ml em tubos de ensaio, as quais foram analisadas por CCF (placas de sílica gel com suporte em alumínio - Merck® 60 F₂₅₄), eluídas em sistemas de solventes orgânicos de acordo com a mistura usada na cromatografia de coluna. As amostras com um perfil cromatográfico idêntico foram agrupadas, recolhidas em balões de evaporação e concentradas num evaporador rotativo sob vácuo, para posterior utilização em testes de avaliação da atividade inseticida.

Foi previsto nos objetivos do projeto, a realização de fracionamento por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Porém a sua execução não foi possível, devido a limitação do tempo e a condicionantes logísticas.

III.3.2. Obtenção de óleos essenciais de *Mentha pulegium* e *Foeniculum vulgare*

Vários fatores influenciam a qualidade, quantidade e composição dos óleos essenciais, nomeadamente o clima, a composição do solo, a época da colheita, a localização geográfica, o órgão da planta utilizado, a idade e a fase do ciclo vegetativo da planta e o método utilizado para a extração (Srivastava *et al.*, 2005).

A extração de óleo essencial de plantas pode ser realizada por diversos métodos, como referidos na introdução. Existem vários tipos de sistemas de extração de óleos essenciais, mas o mais conhecido e utilizado em escala laboratorial é o de Clevenger conhecido desde 1928, processo em que os componentes voláteis da planta são extraídos pela água em ebulição, sendo posteriormente recolhidos por condensação. A amostra obtido por este método de arrastamento de vapor de água é exclusivamente designado de Óleo Essencial (OE). A grande vantagem deste sistema reside na visualização da concentração do óleo destilado e na fácil quantificação do volume de óleo obtido. (Clevenger, 1928; Figueiredo *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais de *M. pulegium* (poejo) e de *F. vulgare* (funcho) foram obtidos no laboratório do Instituto Nacional de Recursos Biológicos (INRB) /Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV) em Oeiras, por hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger modificado a funcionar em circuito fechado. Com este sistema o óleo, volatilizado pela água em ebulição, é condensando por passagem através de uma serpentina de arrefecimento, e recuperado à superfície da água arrefecida junto ao condensador.

Antes de iniciar as extrações procedeu-se à determinação do peso fresco da biomassa a hidrodestilar para posterior cálculo do rendimento. Todos os materiais foram submetidos a uma “moagem” grosseira num moinho “Moulinex”®, modelo 327, antes de serem colocados no balão do hidrodestilador de tipo Clevenger (Figura16).



Figura 16 - Sistema Clevenger adaptado (fotografia da autora).

Os volumes de água destilada adicionados variaram entre 700 ml a 1,4L dependendo, em cada caso, da quantidade/volume da biomassa e tamanho do balão. No final o OE obtido é retirado para um tubo e mede-se o seu volume, calculando-se em seguida o rendimento de extração (ml de OE/g peso seco de biomassa).

Para obtenção do OE de *M. pulegium* (poejo) adicionou-se 700 ml de água destilada a uma amostra de 40 mg de folhas secas e trituradas num balão de fundo redondo, com capacidade de 1 litro, acoplado ao Clevenger. Como fonte de calor, foi utilizada uma manta de aquecimento (Isopad-Labsafe). A extremidade superior do tubo da elevação do vapor foi acoplada a um circuito de arrefecimento a água através de uma serpentina de circulação de água fria, a qual promove a condensação separada do óleo e da água, devido à diferença das respetivas densidades.

A hidrodestilação foi mantida à temperatura de cerca de 100°C, durante 3 horas. Em seguida o sistema foi desligado, mantendo-se a circulação da água de refrigeração durante mais 45 minutos. O óleo essencial assim obtido foi retirado com o auxílio de uma pipeta volumétrica e seco em sulfato de magnésio anidro. Repetiu-se este procedimento o número de vezes necessário para se obter a quantidade de óleo essencial de poejo suficiente para os bioensaios programados. O OE de poejo foi conservado a temperatura ambiente num frasco selado com parafilme.

O óleo essencial de *F. vulgare* (funcho) foi obtido mediante o mesmo protocolo, variando a quantidade de folhas previamente trituradas e o volume de água. Constatou-se que o rendimento da hidrodestilação de OE de funcho é muito baixo, pelo que a obtenção do volume necessário para os ensaios seria incompatível com os prazos a cumprir e o seu transporte de Cabo Verde para Portugal nas quantidades necessárias também se afigurou extremamente difícil. Assim, optou-se por utilizar nos ensaios de bioatividade o OE de funcho proveniente de Cabo Verde e como amostra portuguesa o funcho comercial (Terra Pura®), os quais foram analisados quanto à sua composição química.

III. 3.2.1. Identificação dos constituintes maioritários dos OEs por Ressonância Magnética Nuclear (^1H e ^{13}C RMN)

A espectroscopia de RMN pode ser usada para identificar os compostos numa mistura complexa, como é a dos óleos essenciais. Neste caso não isolamos, mas identificamos os compostos maioritários existentes na mistura, pois o óleo que introduzimos no equipamento não se consome nem se destrói. Embora esta técnica permita também quantificar os compostos numa mistura, foi apenas utilizada para identificação dos compostos maioritários, dado constatar-se que a amostra seria reduzida para efetuar as réplicas necessárias dos ensaios biológicos inicialmente propostos e ser absolutamente necessário disponibilizar uma parte da amostra para fazer caracterização química; este problema foi colmatado na etapa final do trabalho quando com a colaboração de uma equipa da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa se procedeu à análise de Cromatografia Gasosa e Cromatografia Gasosa acoplado por Espectrometria de Massa.

Espectroscopia de RMN

Os espectros de ^1H e ^{13}C RMN foram realizados num espectrómetro Bruker Avance 400[®] que opera a 400,13 e 100,61 MHz, equipado com uma sonda QNP de 5 mm à temperatura ambiente. O óleo essencial (100 mg) foi dissolvido em clorofórmio deuterado (0,5 ml) e submetido às análises de RMN. Todos os valores de desvios químicos são dados em ppm e são calculados relativamente ao padrão interno, o tetrametilsilano (TMS), que foi usado como referência. Nos espectros de ^{13}C RMN foram usados os seguintes parâmetros: SW de 23.98 kHz, com desacoplamento de próton e pulso ^{13}C de 9,0 μs , tempo de relaxação entre scans (D1) 2.0 s, tempo de aquisição de 1,366 s e 64 k. Foi usada a experiência de APT proveniente da livraria Bruker com 1 k de acumulações e com os limites entre +219 a -19 ppm. As atribuições dos desvios químicos e das ressonâncias dos espectros de ^{13}C foram efetuados por comparação com os espectros de amostras padrão de pulegona, mentona, *trans*-anetole, e limoneno e por comparação com espectros de ^{13}C descritos na literatura de mistura de óleos contendo estes compostos (Kubeczka *et al.*, 2002).

III.3.2.2. Análise qualitativa e quantitativa dos constituintes dos OEs

Para a caracterização química dos OEs extraídos da *M. pulegium* e do *F. vulgare* em amostras de Cabo Verde e Portugal, recorreu-se a cromatografia gasosa (GC), o método analítico e cromatográfico mais adequado para a análise de compostos de natureza volátil.

A cromatografia gás-líquido (GC) tem sido muito utilizada nas últimas duas décadas, revelando-se de grande utilidade na separação de misturas complexas de produtos naturais, nomeadamente de óleos essenciais. A volatilidade e polaridade dos constituintes dos óleos essenciais fazem da cromatografia gasosa a técnica de eleição, porque os óleos essenciais são misturas de componentes com propriedades físico-químicas semelhantes. Esta técnica associada à espectrometria de massa (CG-EM), tem-se revelado de grande utilidade na análise dos componentes dos óleos, com particular incidência para os de menor concentração (Barroso *et al*, 1991, Rubiolo *et al*, 2010).

III.3.2.2.1. Cromatografia Gás-Líquido

As análises de Cromatografia Gás-Líquido (CGL) foram efetuadas num cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 400”® equipado com dois Detetores de Ionização de Chama (DIC), um sistema de tratamento de dados e um injetor, no qual foram instaladas duas colunas de polaridade diferente: DB-1 de sílica fundida, de fase imobilizada de metilsilicone, (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.) e DB-17HT de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25µm; J & W Scientific Inc.). A temperatura do forno foi programada de 45°C a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. Atingidos os 300°C a temperatura foi mantida isotérmica durante 10 minutos. A temperatura do injetor e dos detetores foi de, 290°C e 280°C, respetivamente. O gás de arrastamento, hidrogénio, foi ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s e relação de repartição de fluxo foi de 1:50. A composição percentual dos óleos foi determinada pela integração das áreas dos picos sem utilização de fatores de correção. Utilizaram-se

valores correspondentes ao valor médio de duas injeções (Jennings, 1987; Gardais *et al*, 1982).

III.3.2.2.2. Cromatografia Gás-Líquido-Espectrometria de Massa

Nas análises de Cromatografia Gás-Líquido acoplado a Espectrometria de Massa (CGL/EM) utilizou-se um Clarus 600”® equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30mx0,25mm d.i., espessura de filme 0,25µm; J & W Scientific Inc.) ligado a um Clarus 600T Mass Spectrometer”® (versão de programa 4.1). A temperatura do forno foi programada de 45 a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. Atingidos os 300°C a temperatura foi mantida isotérmica durante 10 min, sendo os seguintes os restantes parâmetros a que decorreu a análise: temperatura da linha de transferência, 280°C; temperatura da câmara de ionização, 220°C; gás de arrastamento, hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s; relação de repartição de fluxo, 1:40; energia de ionização, 70 eV; corrente de ionização, 60 µA; gama de massas, 40-300 u; tempo de varrimento, 1s.

A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus índices de retenção, em relação aos dos *n*-alcanos C9-C17 e espectros de massa, com os de padrões comerciais e compostos de referência presentes em óleos existentes no laboratório e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa desenvolvida no laboratório (Adams, 1989).

III.4. Captura de mosquitos

Pesquisou-se a presença de formas imaturas de mosquitos através da utilização de caços e pipetas, em coleções de água potenciais criadouros larvares na região de Santiago Norte, nas localidades de S. Domingos, S. Jorge, Santa Cruz e na zona da Barragem de Poilão na ilha de Santiago. As colheitas foram feitas nos meses de Setembro de 2010, Fevereiro de 2011, Julho e Agosto de 2012.

Foram capturados exemplares imaturos de *Ae. aegypti* e *An. arabiensis*, sendo a primeira espécie encontrada em recipientes com água junto/dentro as habitações (*e.g.*

depósitos de água em varandas, jarras), enquanto a segunda espécie foi encontrada em águas temporárias junto à Barragem de Poilão (Figura 17). Os imaturos foram transportados vivos com água do biótopo em tubos Falcon (Nunc®) e transportados para o insetário do Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Os imaturos capturados na prospeção ativa de dezenas de criadouros foram criados em insetário até à emergência dos adultos. Na fase adulta foi confirmada morfologicamente a identificação ao estereomicroscópio, de acordo com a chave de Ribeiro e Ramos (1980). Os exemplares identificados como pertencentes à espécie *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1972), independentemente do seu local de origem, foram isolados e mantidos em gaiolas separadas de acordo com o dia de emergência.

Devido à possibilidade de transmissão transovárica do vírus da dengue, todos os adultos de *Ae. aegypti* obtidos a partir dos imaturos capturados foram, após a sua morte, preservados a -80°C, isolados em tubos Eppendorf®, para futuro processamento com vista à deteção da eventual presença deste vírus.



Figura 17 - Biótopos de *Ae. aegypti* junto às habitações na região de Santiago Norte (primeira linha) e biótopos de *An. arabiensis*, junto à Barragem de Poilão na ilha de Santiago, em Cabo Verde (segunda linha), fotografia da autora.

Ao fim de 3 meses, a colónia de *Ae. aegypti* já se encontrava com uma produção média suficientemente elevada para execução dos primeiros bioensaios com extratos vegetais. Para além dos bioensaios, foram ainda retiradas amostras de 1155 fêmeas para análise bioquímica em futuros estudos de resistência metabólica a inseticidas, sendo estas também conservadas a -80°C.

Em contrapartida, os esforços desenvolvidos para estabelecer uma colónia de *Anopheles arabiensis*, não foram inicialmente bem-sucedidos, tendo sido todas as posturas obtidas inviáveis. As fêmeas desta espécie mortas foram dissecadas ao estereomicroscópio para isolamento das espermatecas, tendo a observação destas ao microscópio permitido verificar que as fêmeas não se encontravam fecundadas. Este facto deveu-se, provavelmente, a um *ratio* machos/fêmeas muito baixo. Nos finais de Maio de 2011 obtivemos um reforço de uma centena de larvas que completaram o ciclo até à fase adulta mas, mais uma vez e apesar de todos os requisitos descritos na bibliografia essenciais ao estabelecimento em insetário desta espécie terem sido cumpridos, as posturas continuaram inviáveis. Na prospeção efetuada em Cabo Verde durante o mês de Agosto de 2011, procedeu-se a nova colheita de imaturos desta espécie, dos quais obtivemos duzentos adultos e verificando-se novamente a inviabilidade das posturas. Dada a dificuldade na implementação de uma nova colónia a partir da população de Cabo verde desta espécie foi contactada a equipa de Entomologia da Agência Atómica Europeia que, gentilmente cedeu-nos ovos de *An. arabiensis* estirpe Dongola, originária do Sudão, da colónia aí mantida em insetário.

III.4.1. Estabelecimento e manutenção das colónias do mosquito alvo

As colónias de *An. arabiensis* e *Ae. aegypti* foram mantidas ao longo de várias gerações em condições otimizadas de temperatura, humidade relativa e fotoperíodo e segundo os procedimentos descritos na Tabela 7. As condições ambientais durante a fase de criação e bioensaios de sensibilidade foram constantes, de 27±1°C de temperatura, 70±5% de humidade relativa e um fotoperíodo de 12 horas de escuro/luz, estando os adultos de *Ae. aegypti* acondicionados em câmara de segurança.

Os mosquitos na fase adulta foram mantidos em dois tipos de gaiolas: i) gaiola “stock”, para onde diariamente eram transferidos os mosquitos que emergiam e onde se dá a

cópula, disponibiliza a oportunidade de refeição sanguínea e ocorre a oviposição; ii) gaiola de emergência, onde eram colocadas as tinas com pupas a partir das quais emergiam os adultos. Em ambas as gaiolas foi disponibilizada uma solução de sacarose a 10 %. Na gaiola “stock” eram colocadas placas de *Petri* (9 cm de diâmetro) com água, revestidas com papel de filtro para oviposição.

O desenvolvimento larvar decorreu em tinas de aproximadamente 27x18x7 cm³. O número de larvas por tina não foi rigorosamente contado, mas em média era de 200 larvas em primeiro estágio por tina. Foi utilizada água deixada à temperatura ambiente durante, pelo menos, 48 horas antes da utilização. As larvas de *Ae. aegypti* foram alimentadas com comida de peixe (Tetra Menu®) previamente moída, enquanto as larvas de *An. arabiensis* foram alimentadas com comida para alevins Sera Micron®. A colocação da comida foi feita pelo menos duas vezes ao dia (de manhã e no final do dia). As pupas foram diariamente recolhidas para taças e colocadas na gaiola de emergência.

Para além da solução de sacarose a 10% foi disponibilizada às fêmeas a oportunidade de efetuar refeição sanguínea de modo a permitir a maturação ovárica e oviposição. Foram utilizadas duas espécies de roedores: (i) exemplares fêmeas da espécie *Rattus norvegicus*, estirpe *Wistar*; (ii) fêmeas *Mus musculus* Linnaeus, 1758 (da estirpe CD-1), em ambos os casos com idade mínima de 8 semanas. Os espécimes vertebrados foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal, em dosagens adaptadas ao respetivo peso (Hedenqvist & Hellebrekers, 2003), com uma solução combinada de xilazina, na forma de cloridrato, (Rompun® 2% da Bayer, Health Care) e ketamina (Imalgène® 1000, Merial Portuguesa).

Tabela 7 - Rotina semanal de atividades desenvolvidas para manutenção das colônias.

	Gaiola Stock	Gaiola de emergência	Desenvolvimento dos imaturos
Atividades desenvolvidas 2^a - 6^a Feira	Remoção das placas de Petri com as posturas e colocação de novas placas.	Transferência de adultos para stock.	Coleção de pupas vivas e transferência para uma gaiola de emergência.
	Substituição de soluções de sacarose 10 %.	Contagem de pupas mortas, vivas e adultos mortos.	Coleção de larvas/ pupas mortas e remoção de comida em excesso acumulada no fundo das tinas.
	Remoção dos mosquitos mortos no fundo da gaiola com aspirador de 6-Volt.	Contagem de n° de adultos que emergem.	Início de novas tinas de postura retiradas da gaiola stock.
Atividades extras 2^a - 6^a Feira	Refeição sanguínea das fêmeas da gaiola stock		Lavagem das tinas mais sujas

A manipulação dos animais foi feita de acordo com as normas diretivas do Conselho da Comunidade Europeia de 24 de Novembro de 1986 (86/609/EEC) e legislação nacional em vigor (Decreto-lei 129/92 de 6 de Junho, Portaria nº1005/92 de 23 de Outubro). Os espécimes vertebrados foram produzidos e mantidos no Biotério do IHMT, sob a supervisão da Doutora Dinora Ferreira.

Inicialmente, para aumentar a produção da colónia de *An. arabiensis* foi fornecida às fêmeas oportunidade diária de refeição sanguínea, uma vez ultrapassada a etapa de implementação, esta oportunidade foi reduzida para dias alternados.

III.4.2. Otimização dos bioensaios

Antes de iniciar os ensaios de quantificação da bioatividade dos produtos em estudo, foi efetuado um ensaio prévio com uma gama alargada de concentrações de cada um dos extratos /OE a testar, de forma a avaliar a toxicidade dos mesmos em períodos de 24 a

48 horas. Deste modo, foi possível definir as concentrações com atividade letal entre 10% e 100%.

Quando da reconstituição dos extratos, verificou-se que alguns deles apresentavam uma fração de óleo. Foi nestes casos necessária a adição de um agente tensioativo (Tween® 20) de modo a permitir emulsão otimizada do produto em água, meio de desenvolvimento larvar. Assim foi previamente testada uma gama de concentrações deste tensioativo de modo a determinar qual a que não apresentava efeito tóxico sobre as larvas.

Na planificação dos bioensaios de atividade larvicida foi indispensável efetuar uma gestão criteriosa, dos produtos disponíveis para uso, sobretudo no caso dos óleos essenciais, dado ao baixo rendimento da hidrodestilação quer de *F. vulgare*, quer de *M. pulegium* e considerando a amplitude de concentrações a testar e o número de réplicas necessárias. Foi assim, necessário um investimento acrescido de tempo no aumento da produção das colónias das duas espécies em estudo, visto que para cada ensaio, com pelo menos três réplicas de 100 larvas do mesmo estágio, mais os respetivos controlos era necessária uma média de 1500 larvas. No total, para cinco plantas de diferentes espécies, em que duas delas apresentavam quatro amostras, duas de Cabo Verde e duas portuguesas, tratando-se apenas de extratos brutos e OEs totais, a estimativa total era de 10500 larvas de cada espécie de inseto no mesmo estágio de desenvolvimento.

Devido à dificuldade que tivemos na implementação da colónia de *An. arabiensis* não foi possível ter uma produção suficiente de exemplares de modo a realizar os ensaios como inicialmente foram planeados. Não foi possível realizar três réplicas de 100 indivíduos e não foi possível realizar ensaios com os compostos maioritários dos OEs em estudo, como efetuados para *Ae. aegypti*.

III.4.3. Bioensaios larvicidas

Os bioensaios de atividade larvicida foram efetuados de acordo com os testes padronizados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981 [a, b]; WHO, 1998), com ligeiras modificações (protocolo em Anexo II.1).

Os testes da OMS são uma ferramenta de quantificação e de vigilância para detetar alterações na sensibilidade aos inseticidas em populações de vetores, determinando a concentração do composto e o tempo necessário a que o inseto tem de estar exposto para que ocorra a sua morte. Os testes padronizados da OMS são aplicáveis a formas imaturas (larvas) e adultas. Neste estudo optou-se por estes testes dado que estava previsto nos objetivos a determinação da sensibilidade dos insetos a novos produtos, pretendendo-se quantificar as concentrações letais.

A totalidade dos testes foi realizada com larvas das colónias das espécies de mosquito em estudo, instaladas na Unidade de Parasitologia Médica, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical e mantidos em salas com as condições de temperatura, humidade e fotoperíodo anteriormente descritas. Os bioensaios da atividade larvicida (Figura 18) seguiram o mesmo padrão para todos os extratos e/ou óleos essenciais das espécies de plantas em estudo. Contudo, diferiram uns dos outros apenas nas concentrações utilizadas e respetivas quantias de óleos, assim como no volume final da solução.

A temperatura na sala de ensaios foi continuamente monitorizada, tendo variado entre $27\pm 1^{\circ}\text{C}$. Os valores de mortalidade para cada ensaio foram somados e corrigidos relativamente ao valor percentual de mortalidade registada no controlo negativo (solução de Tween®20 a 0,004%) aplicando-se para o efeito a fórmula de Abbott (Abbott 1925).

$$\text{Mortalidade corrigida (\%)} = \frac{\text{Mortalidade bruta (\%)} - \text{Mortalidade da testemunha (\%)}}{100 - \text{Mortalidade da testemunha (\%)}} \times 100$$

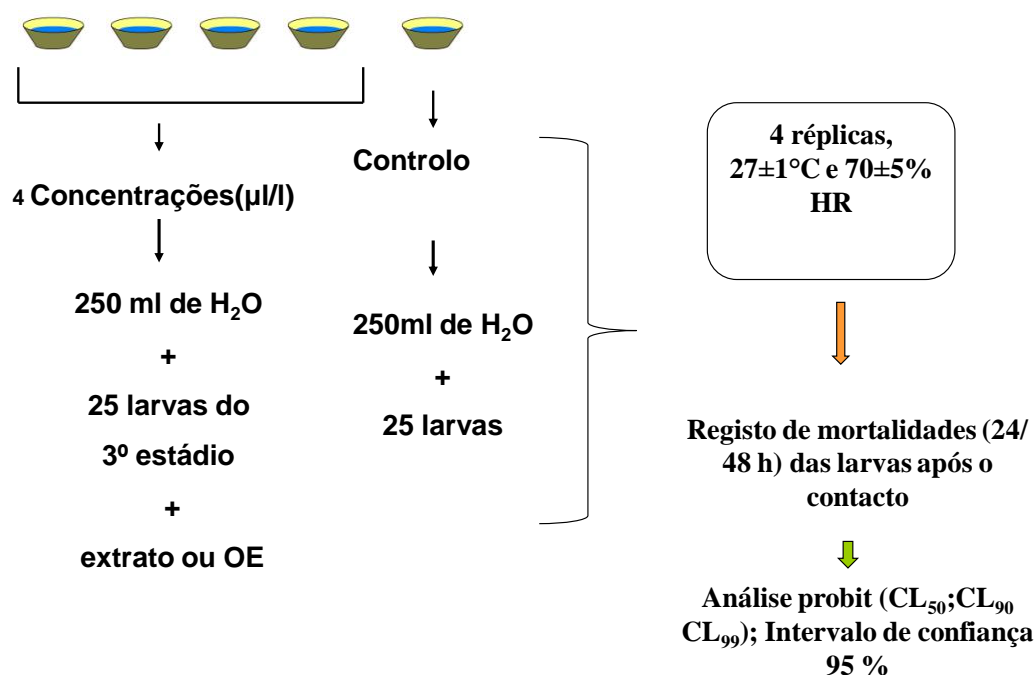


Figura 18 - Esquema geral do bioensaio larvicida.

Os testes padronizados da OMS podem ser divididos em dois tipos de ensaio: aqueles em que se determina a linha de base de resposta ao inseticida (“base line test”) e aqueles designados de testes diagnóstico de resistência. Nos primeiros, grupos de 20 a 25 mosquitos são expostos a concentrações crescentes de um determinado produto por um período fixo de tempo ou, alternativamente, expostos a uma concentração fixa de um composto por períodos crescentes de tempo, até um total mínimo de 100 insetos por concentração/tempo de exposição. A taxa de mortalidade a cada concentração/tempo é determinada e transposta para um papel de probabilidade logarítmica. É através de uma análise de regressão “probit” entre estes dois parâmetros (concentração/tempo de exposição e mortalidade) que se determina a existência ou não, na população em estudo, de suscetibilidade, tolerância ou resistência ao produto testado.

Em populações suscetíveis, é de igual modo através da análise das retas de regressão entre estas duas variáveis que se efetua a estimativa da concentração/tempo de exposição correspondente a 50% e 99,9% de mortalidade, ou seja à LC/LT50 e LC/LT99,9.

III.4.3.1. Bioensaios aduIticidas

O presente estudo foi também baseado nos protocolos da Organização Mundial de Saúde (“baseline test”) para determinação da sensibilidade de adultos aos inseticidas, em que lotes de 25 mosquitos são expostos a concentrações crescentes de um determinado produto de origem vegetal em quatro réplicas (protocolo apresentado em Anexo II.2). A ilustração do ensaio encontra-se na Figura 19.



Figura 19 - Imagens do ensaio aduIticida (fotografia da autora).

Este teste foi efetuado na fase final do projeto, em que já tinham sido avaliadas todas as espécies de plantas em estudo e os seus compostos ativos nas larvas do terceiro estágio de *Ae. aegypti* e de *An. arabiensis*, tendo sido selecionada para o ensaio aduIticida apenas a planta que revelou ser potencialmente melhor larvicida, o *Foeniculum vulgare* de Cabo Verde e Portugal.

III.5. Análise microscópica

As larvas e adultos mortos pela ação dos bioprodutos foram conservados em gluteraldeído 3% e álcool glicerinado (80°/V; 2%) para preparação histológica. As larvas que sofreram mortalidade foram montadas entre lâmina e lamela em meio de montagem de Hoyer para observação microscópica, tendo sido selecionadas, as que estiveram expostas às espécies vegetais com maior efeito larvicida.

A observação foi efetuada em estereomicroscópio (Olympus SZ61) e microscópio óptico (Olympus BX51), utilizando o sistema de captação de imagem Olympus SC30. A avaliação de eventuais alterações estruturais e fisiológicas nos insetos poderão ser indicadores do modo de ação dos produtos responsáveis pela ação larvicida e adulticida.

III.6. Análise estatística

Para verificar se um modelo particular de análise de dados é adequado, o uso de uma estatística de teste é requerido, pelo que no presente estudo, efetuaram-se dois tipos de análise: regressão “probit (teste de Pearson) e regressão logística, (teste da razão de verossimilhança).

Em análise de dados de testes de sensibilidade, particularmente em ensaios do tipo dose-resposta, o método mais utilizado é o “probit”, para os casos em que a suscetibilidade de cada indivíduo é considerada como uma variável aleatória com distribuição normal, (Bliss,1935; Fisher, 1935; Finney, 1971).

No caso de estudo, a estimativa das concentrações com 50% (CL₅₀), 90% (CL₉₀) e 99% (CL₉₉) de mortalidade dos mosquitos, o coeficiente angular (*Slope= declive*) e os intervalos de confiança para a dose, ou o seu logaritmo de base 10, associados com as percentagens de mortalidade entre 0,01% e 99,0% foram determinados pela análise *Probit* com recurso ao software SPSS® para Windows, versão 21 e aos programas Microsoft Excel ® 2010. Este programa SPSS - probit, permite efetuar análise de regressão para conjuntos de dados, em que a variável dependente é avaliada (neste caso

a mortalidade) em função da dose aplicada sendo a resposta representada pela percentagem de mortalidade.

Por conseguinte, através desta análise de regressão, os valores de “probit” foram estimados com base no número de sujeitos que responderam relativamente a um total de indivíduos testados, considerando igualmente a resposta obtida no grupo controlo (ausência de extratos, óleos essenciais e compostos ativos).

Os valores de χ^2 obtidos foram comparados com o valor crítico de χ^2 para um nível de significância de 5%, tendo em conta o número de graus de liberdade (correspondente ao nº de concentrações).

O modelo Probit pode ser expresso matematicamente por:

$$P = F(\alpha + \beta x_i)$$

Onde:

P = Probabilidade da resposta

F = Distribuição da função

α = Intercepto da regressão linear

β = “slope = declive” ou ângulo da regressão linear

x_i = Função da dose - logaritmo da dose [\log_{10} (dose)].

As hipóteses do teste do Coeficiente de Correlação de Pearson são:

Hipótese Nula (H_0): Ocorre um ajuste adequado (igual) dos dados ao modelo de distribuição normal;

Hipótese Alternativa (H_1): Não ocorre um ajuste adequado dos dados ao modelo de distribuição normal.

Ao analisarmos os dados obtidos, não se rejeita H_0 (hipótese nula, de que há um ajuste adequado dos dados ao modelo de distribuição normal), desde que o valor de p (“Sig.”) seja superior a 0,05.

A Regressão Logística é uma regressão múltipla, com uma variável de saída categórica dicotômica (dependente) e variáveis previsoras (explicativas ou independentes) contínuas ou categóricas (Hair *et al.*, 1998). No presente estudo as variáveis independentes são quantitativas contínuas. Visto que a função de verossimilhança resume a informação contida nos dados sobre os parâmetros desconhecidos, uma estatística adequada é o valor da função de verossimilhança quando os parâmetros são

substituídos pelas suas estimativas de máxima verossimilhança. É mais conveniente usar menos duas vezes o logaritmo da verossimilhança maximizada como estatística de teste. Esta estatística não pode ser usada como medida de adequação do modelo, mas para comparar distintos modelos ajustados para os mesmos dados.

Neste caso a hipótese nula (H_0) é de que os coeficientes são iguais a zero, isto é não há relação dose - mortalidade, e a hipótese alternativa (H_1) é de que os coeficientes são diferentes de zero, ou seja a concentração afeta a mortalidade. Esta estatística tem assintoticamente distribuição qui-quadrado com graus de liberdade igual à quantidade v de coeficientes de regressão estimados. O grau de significância utilizado foi de 95%.

Para todas as amostras foi aplicado o teste de Normalidade Kolmogorov-Sminorv e Shapiro-Wilk, que testam a hipótese de os dados apresentarem uma distribuição normal, sendo o último teste mais adequado para amostras de menores dimensões ($N < 50$). Um valor de p (“Sig.”) inferior ao grau de significância indica um desvio na distribuição dos dados em relação à curva de distribuição normal.

No caso de estudo, sempre que as variáveis apresentavam uma distribuição normal foram efetuados os seguintes testes paramétricos:

-Teste t de Student para amostras independentes, permite avaliar a hipótese de igualdade ou diferenças entre duas médias. Na tabela Independent Samples test do SPSS, teremos os resultados do teste estatístico escolhido, calculado de duas formas distintas: -“Equal variances assumed” (assumindo igualdade de variâncias) e -“Equal variances not assumed” (assumindo que as variâncias são desiguais). Para decidir sobre quais destes resultados devem ser utilizados, o SPSS disponibiliza o teste de Levene que testa a hipótese de igualdade das variâncias. Se a significância do teste for ≤ 0.05 : rejeita-se a igualdade das variâncias; se a significância do teste for > 0.05 , assume-se que as variâncias são iguais.

-Teste One-Way ANOVA, isto é, o teste da análise da variância (ANOVA: abreviação proposta por Tukey para Analysis of Variance), indicará a probabilidade de que a hipótese nula seja verdadeira, ou seja, probabilidade de que nenhuma diferença existe entre quaisquer dos grupos. Se a hipótese nula (H_0) for rejeitada, será o indício de que há diferença de atividade em alguma das doses testadas. Para identificar a dose, será

necessário um teste ANOVA de comparação de pares. Os testes de ANOVA baseiam-se na hipótese de que se os grupos são semelhantes, a variância em cada um (dentro) dos grupos é semelhante à variância entre os grupos. Este teste permite comparar a variabilidade das médias de todas as amostras com a variabilidade intrínseca das amostras.

Neste caso as hipóteses formuladas são: H_0 (hipótese nula): não há diferença entre os grupos e H_1 (hipótese alternativa): há diferença entre os grupos.

Para comparação entre duas amostras independentes foram utilizados testes não paramétricos, nomeadamente o teste de Pearson (integrado na análise probit), teste Mann-Whitney U e o teste H de Kruskal-Wallis.

- Teste U de Mann-Whitney, cria um “ranking” (ordenação) de todos os casos (independente do grupo) e depois compara estes “ranking” entre cada grupo.

- Teste H de Kruskal-Wallis é uma alternativa não paramétrica para a análise de variância de um critério de classificação (One-Way ANOVA). Ao serem usados 2 grupos de amostras para comparação, os resultados são os mesmos dos testes de U de Mann-Whitney. À semelhança do teste F de ANOVA paramétrica, um valor significativo de F não indica onde se encontra a diferença, devendo ser realizado o teste de Tukey. Já no teste H de Kruskal-Wallis, para identificar a diferença, deve ser realizado o teste de Dunn, não disponível no SPSS.

As fotografias apresentadas nesta dissertação identificadas como sendo da autora foram tiradas com máquina Olympus SZ-14 (14 Megapixel). As fotografias de microscopia foram obtidas a partir de estereomicroscópio Olympus SZ61 ou microscópio BX51-Olympus, com sistema de captação de imagem SC30.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Identificação do material vegetal

A identificação das espécies vegetais através da análise dos caracteres morfológicos externos permitiu confirmar se os exemplares coletados correspondiam às espécies de plantas inicialmente selecionadas. Foi desta forma possível constatar que os exemplares primeiramente obtidos em Santo Antão não correspondiam a *Mentha pulegium*, tratando-se antes de um híbrido, não podendo por isso ser utilizados no estudo. Por esta razão, foi necessário efetuar nova colheita em Santo Antão, o que atrasou a etapa de preparação do óleo essencial de *M. pulegium* L. cabo-verdiana. Também devido a uma praga agrícola, designada localmente como mil-pés, de nome científico *Spinotarsus caboverdus*, não é autorizada a saída de material vegetal daquela ilha para o exterior, pelo que o processo de secagem e moagem dos exemplares coletados foram efetuados em Santo Antão.

Os exemplares herborizados foram depositados no Herbário do IICT em Lisboa de modo a assegurar a sua conservação, validar os espécimes e a origem geográfica das plantas em estudo.

IV.2. Rendimento de secagem e extração do material vegetal

Findo o período de secagem do material vegetal, determinou-se a massa seca das folhas das espécies *M. azedarach*, *S. nigra*, *A. indica* e das partes aéreas de *F. vulgare* e de *M. pulegium* tendo-se calculado o rendimento de secagem das diferentes amostras (Tabela 8).

Tabela 8 - Rendimento de secagem das plantas em estudo.

Plantas em estudo	Folhas	Total (g)	Rendimento (%)
<i>M. azedarach</i>	Mf	3300,0	40,91
	Ms	1350,0	
<i>S. nigra</i>	Mf	500,0	52,00
	Ms	260,0	
<i>A. indica</i>	Mf	4700,0	48,90
	Ms	2300,0	
<i>M. pulegium</i>	Mf	5000,0	8,80
	Ms	440,0	
<i>F. vulgare</i>	Mf	1350,0	35,19
	Ms	475,0	

Massa fresca-Mf; Massa seca-Ms

Os extratos foram obtidos com uma única extração. O rendimento da extração das três plantas *M. azedarach*, *S. nigra* e *A. indica* foi muito baixo, variando consideravelmente em função dos solventes de extração (Tabela 9). O extrato em acetato de etilo de *S. nigra* teve maior rendimento (10,32%) comparativamente às outras duas espécies. Bezerra *et al.*, 2010, trabalhando com extratos orgânicos de Meliaceae encontrou um rendimento de 13,70% para o extrato de folhas de *A. indica* e 19,79% para folhas de *M. azedarach* quando extraídas com etanol, resultado superior ao encontrado no nosso trabalho em 4,42 e 3,03% respetivamente. Provavelmente, a diferença nos rendimentos foi consequência da metodologia de extração, uma vez que estes autores utilizaram o extrator de Soxhlet para obtenção dos extratos, enquanto que no presente estudo fez-se extração por maceração. Outros estudos, nomeadamente Gnoatto *et al.* (2007), demonstraram que a metodologia de extração influencia diretamente o teor dos compostos presentes nos extratos.

Não se calculou o rendimento do extrato de n-hexano de *A. indica*, porque após a extração obteve-se uma amostra com uma parte solúvel (equivalente ao óleo) e uma parte sólida (precipitado).

Tabela 9 - Peso dos extratos e Rendimento de extração.

Espécie	Solvente	Estrutura	Material Vegetal (g)	Rendimento*	
				(g)	(%)
<i>S. nigra</i>	Acetato de etilo	Folhas	130	13,42	10,32
	Etanol	Folhas	130	5,75	4,42
<i>M. azedarach</i>	Hexano	Folhas	200	1,12	0,56
	Etanol	Folhas	200	6,06	3,03
<i>A. indica</i>	Hexano	Folhas	200	-	-
	Etanol	Folhas	200	7,59	3,79

*obtido a partir da quantidade (g) de material vegetal seco moído

Os OEs de plantas de uma população espontânea de *F. vulgare* obtidos por hidrodestilação das partes aéreas colhidas na fase de infrutescência em agosto de 2011 proporcionaram rendimentos de 0,6%, enquanto a partir das folhas de *M. pulegium*, colhidas na mesma época e local, obteve-se um rendimento de 0,3%. Por sua vez a partir da *M. pulegium* colhida em Évora, na mesma época do ano, obteve-se um rendimento de 0,6%.

IV.3. Caracterização dos extratos de *Sambucus nigra* por Cromatografia em Camada Fina (CCF) e em Coluna (CC)

O extrato vegetal bruto constitui uma matriz complexa, contendo centenas de milhares de metabolitos, que diferem consideravelmente nos seus parâmetros físico-químicos e espectroscópicos.

A caracterização química de extratos brutos é, conseqüentemente, uma tarefa difícil. Porém, o aperfeiçoamento de técnicas analíticas proporcionou um papel importante na elucidação de composições químicas complexas dos produtos de origem vegetal, com níveis elevados de sensibilidade e seletividade, possibilitando o estudo do extrato vegetal bruto sem a necessidade do exaustivo trabalho de isolamento que, muitas vezes, leva a compostos já conhecidos.

Na cromatografia em camada fina, define-se geralmente o fator de retenção e/ou a razão de retardação R_f . Este valor avalia a distância percorrida pela substância e pelo eluente, e a velocidade da frente do eluente ao longo do suporte seco é superior à velocidade média do suporte molhado. Esse valor é calculado de acordo com a fórmula:

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pelo eluente}}{\text{distância percorrida pela frente do solvente}}$$

Para separação dos produtos nos extratos de *S. nigra* por cromatografia em camada fina (CCF), foram testados diversos sistemas de eluentes. O sistema mais adequado para separação do extrato etanólico foi clorofórmio, acetato de etilo e metanol na proporção (20:25:55; v/v) que, após o desenvolvimento do cromatograma nas placas de gel sílica, permitiu visualizar 11 manchas completamente separadas, sendo o fator de retenção (R_f) calculado para cada uma delas (Tabela 10). O perfil cromatográfico das amostras, após revelação com luz ultravioleta a 254 e/ou 366 nm pôde ser visualizado e registrado.

Para separação do extrato em acetato de etilo de *S. nigra* (EtOAc) o sistema de eluente mais adequado foi clorofórmio, acetato de etilo e metanol na proporção (10:30:60; v/v). Nesta amostra, através da técnica de CCF, observaram-se quatro manchas no cromatograma, estando três delas muito próximas, o que impede uma separação sem contaminação, e uma mancha mais isolada.

Tabela 10 - Fator de retenção das manchas observadas na TLC em *S. nigra* (EtOH).

	Rf*	Cor (UVA 366nm)
1	0,366	Castanho
2	0,423	Roxo
3	0,463	Amarelo
4	0,521	Amarelo
5	0,606	Roxo
6	0,620	Amarelo
7	0,662	Roxo
8	0,690	Amarelo
9	0,746	Laranja
10	0,803	Castanho
11	0,870	Branco

Os extratos etanólico e de acetato de etilo de *S. nigra* foram posteriormente purificados por Cromatografia em Coluna. As misturas de solventes para cada um destes extratos encontram-se no Anexo III, Tabelas III1 e III2. Da eluição de 200 mg do extrato de *S. nigra* (EtOH) com as diferentes misturas de solventes obtiveram-se 31 amostras, as quais depois de devidamente marcadas, foram reanalisadas por CCF. As amostras, provenientes do cromatograma em CCF, foram agrupadas segundo a semelhança do padrão das bandas observadas, quer no visível, quer no espectro do UV a 366 e 254 nm, Anexo III (Figura III.1). Deste procedimento resultaram 10 amostras que foram evaporadas e conservadas a 4°C, para posterior análise em cromatografia líquida de alta resolução (HPLC).

Quanto ao extrato EtOAc de *S. nigra*, efetuou-se análise por Cromatografia em Coluna, tendo-se obtido 38 amostras, as quais foram igualmente reanalisadas por CCF e os resultados do cromatograma permitiram obter 12 amostras, que foram também evaporadas e conservadas, para caracterização química complementar por HPLC.

Devido ao elevado volume de trabalho e a dificuldades de obtenção e processamento do material vegetal, foi impossível concretizar dentro do tempo estipulado, a execução na íntegra da análise química de todas as espécies inicialmente consideradas. Assim a caracterização dos extratos de sabugueiro teve que ser interrompida na fase de caracterização química, tendo sido otimizadas todas as condições básicas para complementar este estudo no futuro e deu-se ênfase a um estudo, o mais completo possível, de caracterização dos óleos essenciais de *M. pulegium* e *F. vulgare*, cuja

atividade nos ensaios preliminares revelaram ser bastante promissores. Contudo em relação ao extrato de *S. nigra* a sua caracterização química deverá ser complementada em estudos subsequentes visto que, apesar de ser pouco conhecida a sua ação inseticida, este projeto permitiu confirmar a sua ação larvicida em *Ae. aegypti*, com resultados a aprofundar.

IV.4. Caracterização dos óleos essenciais da *Mentha pulegium* e *Foeniculum vulgare* por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG-EM) e por Ressonância Magnética Nuclear de (^1H e ^{13}C RMN)

Diferentes técnicas cromatográficas e espectroscópicas estão disponíveis atualmente para a caracterização de óleos essenciais. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) é a técnica usual para análise qualitativa e quantitativa dos componentes voláteis (terpenos) que constituem os óleos essenciais. A análise qualitativa recorre à comparação com amostras padrão ou por comparação com OEs cujos componentes já foram previamente identificados. Por vezes, e em caso de dúvida a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) surge como uma valiosa metodologia para a caracterização e confirmação de compostos voláteis de OEs. A aplicação da espectroscopia de ^{13}C RMN na análise de OEs oferece algumas vantagens, na medida em que se trata de uma técnica de rápida execução e elevada sensibilidade, que permite analisar as amostras à temperatura ambiente, sem degradação dos componentes instáveis. A análise qualitativa de OE é baseada na comparação do espectro do óleo com espectros dos componentes de óleos puros (compostos padrão), que foram obtidos sob as mesmas condições (solvente, temperatura, referência, concentração e outros parâmetros), ou pela comparação com outros óleos com composição semelhante.

As amostras de OE de *M. pulegium* de Cabo Verde e de Portugal (Évora), de OE de *F. vulgare* de Cabo Verde e OE comercial de *F. vulgare* de Portugal foram analisadas por CG e CG-EM e os resultados da caracterização qualitativa encontram-se nas Tabelas 12 e 13. Assim, OE de *M. pulegium* proveniente de Cabo Verde é constituído maioritariamente por mentol (30,4%), mentona (15,3%) e acetato mentilo (14,7) e pelos compostos minoritários pulegona (4%), mentofurano (3,8%), linalool (3,3%), neo-

mentol (2,5%) e β -cariofileno (2,5%). Estes compostos representam 94,7% da composição total do óleo essencial.

O OE de *M. pulegium* de Portugal é maioritariamente constituído por pulegona (61,4%), mentona (20,1%), *iso*-mentona (6,0%) e vestígios de mentol (1,5%), os quais representam 93,2% da composição total do OE. No que diz respeito ao agrupamento pelo tipo de compostos, uma comparação entre os OEs de *M. pulegium* de Cabo Verde e de Portugal, permitiu verificar uma ligeira diminuição do teor total de hidrocarbonetos monoterpénicos, hidrocarbonetos sesquiterpénicos, sesquiterpenos oxigenados. É de salientar a presença de vestígios de fenilpropanóides na amostra portuguesa (0,5%) e a prevalência do grupo de monoterpénos oxigenados nas duas amostras (80,6 e 90,9%).

Efetivamente, o estudo da composição do OE de *M. pulegium* de Cabo Verde por CG-EM revelou-se mais complexo que o OE da planta de Portugal, tendo os perfis de composição apresentado diferenças significativas (Tabela 11 e Anexo IV, Figura IV.1).

Os dados obtidos da análise de OE de *M. pulegium* de Portugal estão de acordo com os resultados publicados por Figueiredo *et al.*, 2010. Nesse estudo efetuou-se a análise de 18 amostras de OEs de *M. pulegium* de Portugal, tendo sido observada a presença de 96-97% de monoterpénos oxigenados. Os compostos dominantes nos óleos analisados também foram, a pulegona **1** (7-65%), mentona **2** (6-20%) e *iso*-mentona (0,4-17%). As diferenças observadas na composição das plantas da mesma espécie, mas de origem geográfica diferente podem ser atribuídas ao facto de que a composição do óleo essencial varia com as condições ambientais, práticas agrícolas, fatores genéticos e as condições ecológicas da planta (Telci, *et al.*, 2006; Fuente, *et al.*, 2003). De acordo com Msaada *et al.*, 2007, os estágios de maturação também influenciam a composição do OE e as práticas agrícolas e condições ambientais contribuem para incrementar o rendimento e a qualidade do OE.

Tabela 11 - Composição por CG dos óleos essenciais de *M. pulegium* de Cabo Verde e Portugal.

Componentes	RI	<i>Mentha pulegium</i>	
		Cabo Verde	Portugal
α -Tujeno	924	t	
3-Metilciclohexanona			t
α -Pino	930	0.3	0.5
Canfeno	938		t
Sabineno	958	0.2	t
3-Octanona	961		t
			0.4
β -Pino	963	0.5	
3-Octanol	974	t	0.3
β -Mirceno	975	1.1	
α -Terpineno	1002	0.1	
<i>p</i> -Cimeno	1003	0.2	0.1
1,8-Cineol	1005	0.9	0.9
Limoneno	1009	2.3	0.2
<i>cis</i> - β -Ocimeno	1017	0.3	
<i>trans</i> - β -Ocimeno	1027	0.1	
γ -Terpineno	1035	0.2	
Hidrato de <i>trans</i> -Sabineno	1037	0.1	
Fenchona	1050		0.2
Terpinoleno	1064	0.1	
Linalol	1074	3.3	0.3
Acetato de 3-octanol *	1086		0.3
<i>trans</i> -Verbenol	1114		T
Mentona	1120	15.3	20.1
<i>iso</i> -Mentona	1126	0.9	6
Mentofurano	1134	3.8	0.3
<i>cis-iso</i> -Pulegona	1134		1.4
<i>neo</i> -Mentol	1139	2.5	
Lavandulol	1142	t	
Mentol	1148	30.4	1.5
Terpinen-4-ol	1148	t	
<i>iso</i> -Mentol	1154	0.1	
α -Terpineol	1159	0.6	0.1
Verbenona	1164		0.4
Pulegona	1210	4.0	61.4
Piperitona	1211	1.7	0.3
Acetato de linalilo	1245	1.5	
Epóxido de petasiteno *			0.8
<i>trans</i> -Anetol	1254		0.3
Timol	1275	0.1	
Acetato de lavandulilo	1278	0.1	
Acetato de mentilo	1278	14.7	0.6
Piperitenona	1289	0.1	0.4
Acetate de nerilo	1353	0.2	
Acetate de geranilo	1370	0.3	
<i>cis</i> -Jasmona	1372	0.3	
β -Burboneno	1379	0.2	

Componentes	RI	<i>Mentha pulegium</i>	
		Cabo Verde	Portugal
α -Gurjuneno	1400	0.4	
β -Cariofileno	1414	2.5	
<i>trans</i> - β -Farneseno	1455	0.3	
Germacreno D	1474	2.0	
Biciclogermacreno	1487	0.5	
<i>trans</i> -Calameneno	1505	0.1	
δ -Cadineno	1505	0.3	
Elemicina	1525		0.2
Elemol	1530	0.3	
Viridiflorol	1569	1.4	
α -Cadinol	1626	0.4	
% Identificação		94.7	93.2
Agrupamento dos constituintes			
Hidrocarbonetos monoterpênicos		5.4	1.2
Monoterpenos oxigenados		80.6	90.9
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		6.3	t
Sesquiterpenos oxigenados		2.1	t
Fenilpropanóides			0.5
Outros		0.3	0.6

RI - Índice de retenção relativa a C₉-C₁₇ *n*-alcanos na coluna DB-1;

t - trace (<0.05);

* - Identificação baseado apenas no espectro de massa.

Quanto aos OEs de *F. vulgare* de Cabo Verde e comercial de Portugal, as análises cromatográficas revelaram composições distintas (Tabela 12 e Anexo IV, Figura IV.2). No OE de *F. vulgare* de Cabo Verde foram identificados trinta e um constituintes, sendo identificada 97,6 % da composição total deste OE. Os compostos maioritários do OE deste *F. vulgare* são *trans*-anetol (31,8%), limoneno (28,4%), fenchona (9,7%), β -pineno (7,3%), α -pineno (4,9%) e os minoritários *p*-cimeno (1,9%), β -mirceno (1,8%), acetato de β -fenchilo (1,7%) e estragol (1,3%).

No OE comercial de *F. vulgare* de Portugal foram detetados trinta e seis constituintes, vinte e um dos quais foram identificados, perfazendo cerca de 98,9% do OE. A análise cromatográfica do OE comercial de *F. vulgare* de Portugal revelou ser uma mistura complexa de *p*-cimeno (6,9%), β -pineno (5,2%), estragol (3,1%), entre outros, sendo também os compostos maioritários o *trans*-anetol (29,8%), limoneno (17,5%), α -pineno (11,9%) e fenchona (9,6%). Quanto ao tipo de compostos, observou-se predominância de hidrocarbonetos monoterpênicos (47,0 e 52,6 %) nos OEs de *F. vulgare* de Cabo

Verde e Portugal, seguido de fenilpropanóides (34,3 e 33,7 %) e monoterpenos oxigenados (15,8 e 12,6 %) respetivamente.

Tabela 12 - Composição por CG dos óleos essenciais isolados de *F. vulgare*.

Componentes	RI	<i>Foeniculum vulgare</i>	
		Cabo Verde	Portugal
Triciclono	921	t	t
α -Tujano	924	t	0.1
α -Pino	930	4.9	11.9
Canfeno	938	0.4	0.9
Sabineno	958	t	0.3
β -Pino	963	7.3	5.2
2-Pentil furano	973	t	t
β -Mirceno	975	1.8	3.7
α -felandreno	995	0.7	4.4
δ -3-Careno	1000		0.3
α -Terpineno	1002	t	0.1
<i>p</i> -Cimeno	1003	1.9	6.9
1,8-Cineol	1005	t	2.5
β -Pelandreno	1005	t	t
Limoneno	1009	28.4	17.5
<i>cis</i> - β -Ocimeno	1017	0.4	0.7
<i>trans</i> - β -Ocimeno	1027	t	0.2
γ -Terpineno	1035	1.1	0.3
Fenchona	1050	9.7	9.6
Terpinoleno	1064	0.1	0.1
Linalol	1074	t	0.1
Isopentil de isovalerato	1084	t	t
óxido <i>cis</i> -Limoneno	1095	0.1	t
Câmfora	1102	0.1	t
óxido <i>trans</i> -Limonene	1112	1.0	t
<i>cis</i> -Verbanol	1113	t	t
<i>trans</i> -Verbanol	1114	t	t
Mentona	1120	0.8	
Pinocarvona	1121	0.1	
<i>iso</i> -Mentona	1126	t	
Mentol	1148	t	
Terpinen-4-ol	1148	0.3	0.1
Mirtenal	1153	t	
<i>cis</i> -Dihidrocarvona	1159	t	
α -Terpineol	1159	t	0.2
Metil chavicol (= Estragol)	1163	1.3	3.1
Mirtenol	1168	0.1	
<i>trans</i> -Carveol	1189	0.5	
<i>cis</i> -Carveol	1202	0.3	t
Pulegona	1210	0.8	
<i>p</i> -Anisalaldeído *	1210	0.8	0.5
Carvona	1210	t	
β - Acetato de fenchilo	1212	1.7	
<i>cis</i> -Anetol	1220	t	0.3
<i>trans</i> -Anetol	1254	31.8	29.8
Acetato de Bornilo	1265	t	
Carvacrol	1286	0.2	t
α -Copaeno	1375	0.2	

β -Cariofileno	1414	t	t
<i>trans</i> - α -Bergamoteno	1434	t	
α -Humuleno	1447	t	
<i>trans</i> -Metil-iso-eugenol	1471	0.4	
Aril curcumeno	1474	0.1	
Germacreno D	1474	0.1	
δ -Cadineno	1505	0.1	
Elemicino	1525	t	
% Identificação		97.6	98.9
Constituintes agrupados			
Hidrocarboneto Monoterpénico		47.0	52.6
Monoterpeno oxigenado		15.8	12.6
Hidrocarboneto Sesquiterpénico		0.4	t
Fenilpropanóide		34.3	33.7
Outros		t	t

RI - Índice de retenção relativa C₉-C₁₆ *n*-alcanos na coluna DB-1; - trace (<0.05);

* - Identificação baseada no espectro de massa.

Muitos estudos fitoquímicos sobre a composição do óleo essencial de *F. vulgare* de diferentes origens geográficas demonstraram que os constituintes maioritários desta planta são derivados de fenilpropanóides e monoterpenóides, o que confirma os resultados obtidos neste estudo (Renjie *et al.*, 2010; Diaz-Maroto *et al.*, 2006; Ozcan, 2006).

Os resultados obtidos a partir da análise de CG e CG-EM de OE de *F. vulgare* comercial de Portugal foram concordantes com o estudo efetuado por Miguel *et al.*, 2010. Estes autores caracterizaram o OE comercial de partes aéreas de *F. vulgare* de origem portuguesa, por CG e CG-EM, tendo-se obtido como fração dominante hidrocarbonetos monoterpénicos (56-64%) e como constituintes maioritários fenilpropanóides como o *trans*-anetol (31-36%), seguido de α -pineno (14-20%) e limoneno (11-13%).

As diferenças por vezes observadas entre diferentes estudos de caracterização química podem ser devidas a vários fatores. As percentagens relativas destes componentes nos OEs dependem das subespécies (*vulgare* e *piperitum*), variedades (*azoricum* Mill. Thell. (Florença), *dulce* Mill. Thell. (doce) e *vulgare* Mill. Thell. (amargo)) e quimiotipos, órgãos da planta, ontogénese, origem, condições ambientais, tipo e condições de extração, (Miguel *et al.*, 2010).

Em ambos os trabalhos não há qualquer informação quanto à variedade da planta em estudo, visto que se trata de OEs comerciais; por conseguinte, não se pode referir se se trata de uma ou outra variedade ou se são da mesma variedade. No entanto, a literatura refere que, por exemplo, os teores de *trans*-anetol, estragol e fenchona têm constituído o critério determinante para distinguir a variedade doce (*dulce*) da amarga (*vulgare*). O *trans*-anetol, de sabor anisado e doce, tem sido referido como o principal composto do OE de funcho-doce, representando mais de 80%. A presença de fenchona (percentagens superiores a 15 %) tem sido indicada, como decisiva na identificação da variedade amarga, devido ao caráter pungente e canforeáceo que este composto confere ao OE (Miraldi, 1999). Porém, as indicações das farmacopeias acerca das variedades são bastante divergentes, sendo que algumas nem estabelecem distinções fitoquímicas (Miraldi, 1999). A maioria dos investigadores atribuem a predominância de estragol e/ou da fenchona relativamente ao anetol como uma característica distintiva da variedade *vulgare*, embora outros compostos como o α -felandreno, estejam presentes em elevadas quantidades, podendo contribuir para o sabor amargo e o aroma pungente desta variedade.

Os OEs de *M. pulegium* e *F. vulgare* de Cabo Verde foram pela primeira vez caracterizados qualitativamente e quantitativamente, sendo os resultados do perfil químico do *F. vulgare* comparáveis a um estudo efetuado com 3 variedades de *F. vulgare* de origem egípcia (Shahat *et al.*, 2011). Nesse trabalho, os autores constataram que as variedades *azoricum* e *dulce* são semelhantes, na sua composição química, mas diferem muito da variedade *vulgare*. *trans*-Anetol representou 61% e 46% nos OEs das variedades de *azoricum* e *dulce*, respetivamente, enquanto na variedade *vulgare* representava apenas 5%. Por outro lado, o estragol foi o principal composto do OE da variedade *vulgare*, com uma concentração de 58% em comparação com apenas 12% e 6% nos OEs das variedades *azoricum* e *dulce*, respetivamente. Outros componentes maioritários, incluindo pineno, limoneno e fenchona foram encontrados em todos os três óleos analisados. Eucaliptol foi detetado nos OEs das variedades *azoricum* e *vulgare*, mas estava ausente na variedade *dulce*.

A comparação da composição química de *F. vulgare* de Cabo Verde com as três variedades do *F. vulgare* do Egipto demonstra uma semelhança entre a amostra de Cabo

Verde (*trans*-anetol- 29,8 %; estragol- 3,1% e ausência do eucaliptol) e a variedade *dulce* de origem egípcia.

Para rapidamente selecionar alguns compostos maioritários e avaliar a sua ação larvicida optou-se pela identificação dos compostos maioritários de OEs de *M. pulegium* L. e *F. vulgare* Mill., pela técnica de RMN e deste modo foi possível reaproveitar todo o material, visto que o óleo introduzido no equipamento não se consome, nem se destrói. Os OEs obtidos de folhas de *M. pulegium* e partes aéreas de *F. vulgare* de Cabo Verde e de Évora, Portugal, foram analisados por RMN de ^{13}C . Dado o baixo rendimento do OE de *F. vulgare* de Portugal optou-se por utilizar o óleo comercial de *F. vulgare* de origem portuguesa.

A análise por RMN do OE de *M. pulegium* de Portugal (Tabela 13 e Anexo V, Figuras V.1 e V.2) mostrou que a pulegona **1** é o seu principal composto, seguido de mentona **2** (Figura 20), enquanto no OE de Cabo Verde foram detetados vestígios de pulegona **1** sendo este óleo uma mistura complexa de mentona, mentol entre outros compostos terpénicos (espetros não apresentados).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C do OE de funcho de Cabo Verde detetou-se que o *trans*-Anetol **4** e limoneno **5** (Figura 20) são os constituintes maioritários (Tabela 14 e Anexo V, Figuras V.3 e V.4). Enquanto que o OE de funcho comercial de Portugal aparenta ser uma mistura complexa de fenchona, α -pineno, p-cimeno, α -felandreno, estragol e *cis*-anetol, entre outros (espetros não apresentados). Este estudo preliminar demonstrou que *F. vulgare* de Cabo Verde pode ser considerado um químiotipo devido aos níveis elevados de *trans*-anetol **4** e limoneno **5**.

Estes dados estão de acordo com os apresentados na literatura para este tipo de compostos (Guerrini *et al.*, 2006).

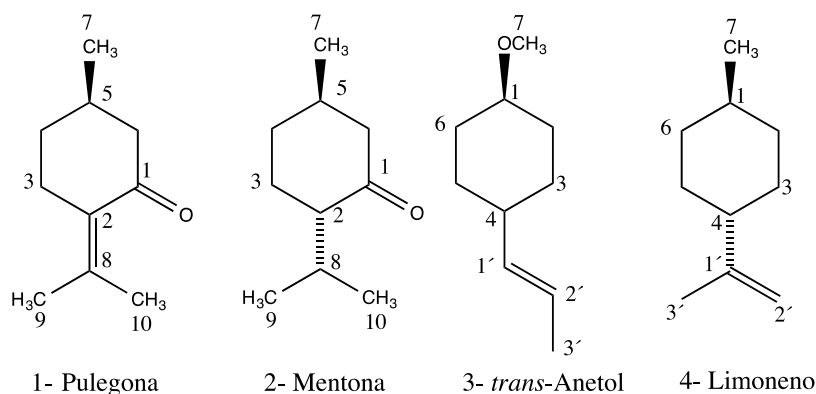


Figure 20 - Estrutura química dos principais compostos que constituem os OEs da *M. pulegium* e *F. vulgare*.

Tabela 13 - Identificação dos constituintes maioritários da análise de RMN de ^{13}C do OE de *Mentha pulegium* de Portugal (Equipamento de RMN 400 MHz).

Pico	Composto	$\delta(\text{ppm})$	Atribuição
1	Mentona 2	18,62	CH_3 (C-9)
2	Mentona 2	21,13	CH_3 (C-7)
3	Pulegona 1	21,70	CH_3 (C-7)
4	Pulegona 1	22,04	CH_3 (C-9)
5	Mentona 2	22,22	CH_3 (C-10)
6	Pulegona 1	22,93	CH_3 (C-10)
7	Mentona 2	25,82	CH (C-8)
8	Mentona 2	27,81	CH_2 (C-3)
9	Pulegona 1	28,55	CH_2 (C-3)
10	Pulegona 1	31,52	CH (C-5)
11	Pulegona 1	32,72	CH_2 (C-4)
12	Mentona 2	33,84	CH_2 (C-4)
13	Mentona 2	35,41	CH (C-5)
14	Mentona+ Pulegona 1+2	50,76	CH_2 (C-6)
15	Mentona 2	55,76	CH (C-2)
16	Pulegona 1	131,60	C=C (C-2)
17	Pulegona 1	141,78	C=C (C-8)
18	Pulegona 1	204,05	C=O (C-1)
19	Mentona 2	212,23	C=O (C-1)

*Os grupos metilo podem permutar.

Tabela 14- Identificação dos compostos maioritários da análise por RMN de ^{13}C do OE do *F. vulgare* de Cabo Verde (Equipamento de RMN de 400 MHz).

Pico	Composto	$\delta(\text{ppm})$	Atribuição
1	<i>trans</i> -Anetol 3	18,53	CH_3 (C-3)
2	Limoneno 4	20,94	CH_3 (C-3')
3	Limoneno 4	23,60	CH_3 (C-7)
4	Limoneno 4	28,06	CH_2 (C-5)
5	Limoneno 4	30,73	CH_2 (C-6)
6	Limoneno 4	30,94	CH_2 (C-3)
7	Limoneno 4	41,22	CH (C-4)
8	<i>trans</i> -Anetol 3	55,38	CH_3 (C-7)
9	Limoneno 4	108,49	CH_2 (C-2')
10	<i>trans</i> -Anetol 3	114,02	CH (C-2 e C-6)
11	Limoneno 4	120,77	CH (C-2)
12	<i>trans</i> -Anetol 3	123,58	CH (C-2')
13	<i>trans</i> -Anetol 3	126,99	CH (C-3 e C-5)
14	<i>trans</i> -Anetol 3	130,47	CH (C-1')
15	<i>trans</i> -Anetol 3	130,95	$\text{C}=\text{C}$ (C-4)
15	Limoneno 4	150,39	$\text{C}=\text{C}$ (C-1')
16	<i>trans</i> -Anetol 3	158,69	$\text{C}=\text{C}$ (C-1)

IV.5. Bioensaios larvicidas com os extratos das meliáceas

Em relação às meliáceas, *A. indica* ("neem") e *M. azedarach*, os ensaios preliminares revelaram atividade larvicida apenas para os extratos em *n*-hexano (Anexo VI). Contudo, ao efetuar as réplicas necessárias verificou-se por um lado que os resultados não eram reprodutíveis e, por outro, havia sempre elevada mortalidade no grupo controlo (mistura de água e solvente). A mortalidade registada no grupo controlo foi eliminada com sucessivas diluições do extrato e concentração deste num menor volume possível. Mas a falta de reprodutibilidade ao longo dos ensaios, foi incontornável, pelo que, dado à limitação do tempo para execução deste projeto, não foi possível avaliar a atividade larvicida dos extratos destas duas plantas, como inicialmente previsto.

Em relação ao extrato de *A. indica* foi preparada uma solução "stock" de 50 mg/ml, a partir da qual foram testadas sucessivas diluições (850,0; 950,0; 1050,00; 1150,0 μl) de extrato. Em ensaios preliminares estes extratos revelaram mortalidade variável sobre as larvas entre os 12 e 72 %, mas estas mortalidades sofreram alterações drásticas ao longo dos sucessivos ensaios, apesar das condições a que as réplicas foram realizadas terem sido padronizadas.

O facto de a extração de *A. indica* em *n*-hexano ter originado uma fração oleosa e outra sólida dificultou a otimização das emulsões com o tensioativo selecionado e fez variar as características do produto usado. Testaram-se dois tensioativos, Tween®20 e Triton®100, tendo o último sido bastante tóxico em diluições inferiores a 0,005%, pelo que se decidiu efetuar todos os ensaios larvicidas com Tween®20 a 0,004%.

IV.6. Análise estatística dos bioensaios larvicidas e adulticidas

Todos os resultados obtidos dos bioensaios larvicidas e adulticidas foram submetidos a tratamento estatístico, recorrendo ao programa SPSS - probit, pretendendo efetuar análise de regressão para o conjunto de dados, em que a variável dependente (mortalidade) é medida em função da variável independente (concentração ou dose aplicada), sendo a resposta representada pela percentagem de mortalidade. As hipóteses estabelecidas foram:

- Hipótese Nula (H_0): $\rho > \alpha$ (0,05) - Há um ajuste adequado dos dados ao modelo de distribuição normal.
- Hipótese alternativa (H_1): $\rho < \alpha$ (0,05) - Não há um ajuste adequado dos dados ao modelo de distribuição normal.

Recorrendo à análise probit obtiveram-se valores de probabilidade estimados de dose-mortalidade, tendo por base os dados observados. O teste de qualidade de ajuste, Qui-Quadrado de Pearson mostrou que a transformação probit foi adequada para obter a curva de dose-resposta, para as plantas *F. vulgare* de Portugal, *F. vulgare* de Cabo Verde, *S. nigra* de Portugal, *M. pulegium* de Cabo Verde e para os compostos ativos *trans*-anetol e pulegona, conforme a Figura 21. Os valores de p_1 (Significância) para as plantas anteriormente referidas foram superiores ao α (0,05), confirmando a qualidade do ajustamento (Figura 22). Os valores de R^2 obtidos da regressão entre as doses (concentrações) observadas e estimadas são superiores a 98 %, validando o modelo de distribuição de probit utilizado neste estudo, para prever a probabilidade de mortalidade em função da concentração aplicada (Figura 23).

Porém o teste de qualidade de ajuste, Qui-Quadrado de Pearson, mostrou que a transformação probit não confirmou um bom ajustamento da curva dose - resposta para as seguintes duas espécies vegetais (a, b, c) e os compostos ativos (d,e):

- a) *M. pulegium* de Portugal (atividade nas larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti*);
- b) *F. vulgare* de Portugal (em mosquitos adultos de *Ae. aegypti*);
- c) *F. vulgare* de Cabo Verde (atividade nas larvas do 3º estágio de *An. arabiensis* e nos adultos de ambas as espécies);
- d) (-)-limoneno, (+)-limoneno (atividade nas larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti*);
- e) e estragol (atividade nas larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti*).

Por conseguinte recorreu-se a outro teste que avalia a relação entre dose-mortalidade referentes às espécies vegetais e compostos ativos acima referidos, ou seja, ao teste Qui-Quadrado da razão de verossimilhança. Tal teste permite melhorar a habilidade de prever a ocorrência de mortalidade, sendo expresso pelo baixo valor do logaritmo de verossimilhança e de p_2 (significância). Foram estabelecidas as seguintes hipóteses para:

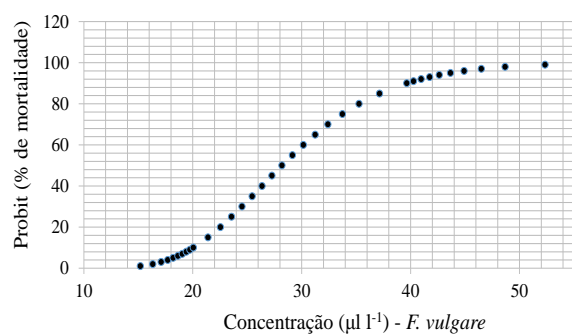
- **H₀**: Há uma relação direta entre a dose aplicada e a mortalidade observada.
- **H₁**: Não há uma relação direta entre a dose aplicada e a mortalidade observada.
- $\alpha=0,05$

Na tabela 15 resume-se os resultados da aplicação dos referidos testes. Relativamente a estas plantas/compostos ativos (situações anteriormente referidas como a, b, c, d, e), em que não houve um bom ajustamento para a curva dose-mortalidade pelo teste de verossimilhança do Qui-Quadrado confirmou-se que não há uma relação direta entre as percentagens de mosquitos mortos (variável dependente) e as doses aplicadas (variável independente), sendo os valores de p_2 inferiores ao nível de significância estabelecido ($\alpha= 0,05$).

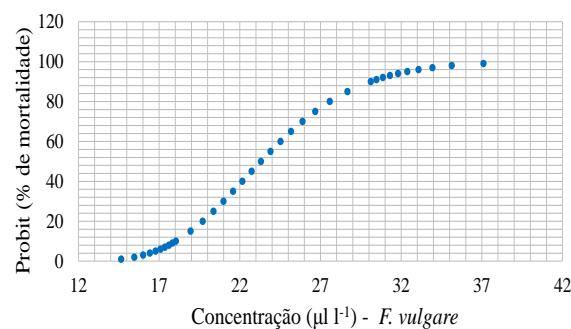
Tabela 15 - Testes de Pearson e Verossimilhança do Qui-Quadrado aplicados aos dados e os respectivos parâmetros estatísticos, [Qui-Quadrado (χ^2), graus de liberdade (df), sigma (p) e alfa (α)].

Espécies vegetais	2xLog VS	χ^2	Graus de liberdade (df)	Sigma p	Alfa (α)	Conclusão
<i>F. vulgare</i> Portugal (<i>Ae. aegypti</i> /L ₃)	-	1,825	3	0,609	0,05	$p_1 > \alpha$; NRH ₀
<i>F. vulgare</i> CV (<i>Ae. aegypti</i> / L ₃)	-	0,535	2	0,765	0,05	$p_1 > \alpha$; NRH ₀
(-)-limoneno 4 (<i>Ae. aegypti</i> / L ₃)	-	12,662	3	0,005	0,05	$p_1 < \alpha$; RH ₀
	16,094	-	4	0,003	0,05	$p_2 < \alpha$; RH ₀
(+)limoneno 4 (<i>Ae. aegypti</i> /L ₃)	-	15,562	3	0,001	0,05	$p_1 < \alpha$; RH ₀
	16,094	-	3	0,003	0,05	$p_2 < \alpha$; RH ₀
Estragol (<i>Ae. aegypti</i> /L ₃)	-	8,555	3	0,036	0,05	$p_1 < \alpha$; RH ₀
	16,094	-	4	0,003	0,05	$p_2 < \alpha$; RH ₀
<i>trans</i> -anetol 3 (<i>Ae. aegypti</i> / L ₃)	-	4,885	3	0,180	0,05	$p_1 > \alpha$; NRH ₀
<i>S. nigra</i> (<i>Ae. aegypti</i> / L ₃)	-	0,222	2	0,895	0,05	$p_1 > \alpha$; NRH ₀
<i>M. pulegium</i> Port (<i>Ae. aegypti</i> /L ₃)	-	28,146	4	0,000	0,05	$p_1 < \alpha$; RH ₀
	21,061	-				$p_2 < \alpha$; RH ₀
<i>M. pulegium</i> CV (<i>Ae. aegypti</i> /L ₃)	-	1,734	4	0,785	0,05	$p_1 > \alpha$; NRH ₀
Pulegona 1 (<i>Ae. aegypti</i> /L ₃)	-	6,996	3	0,072	0,05	$p_1 > \alpha$; NRH ₀
<i>F. vulgare</i> Port (<i>An. arabiensis</i> /L ₃)	-	5,324	3	0,150	0,05	$p_1 > \alpha$; NRH ₀
<i>F. vulgare</i> CV (<i>An. arabiensis</i> /L ₃)	-	10,579	3	0,014	0,05	$p_1 < \alpha$; RH ₀
	16,094	-	4	0,003	0,05	$p_2 < \alpha$; RH ₀
<i>F. vulgare</i> Port/(<i>Ae. aegypti</i> / adultos)	-	10,620	2	0,005	0,05	$p_1 < \alpha$; RH ₀
	11,090	11,090	3	0,011	0,05	$p_2 < \alpha$; RH ₀
<i>F. vulgare</i> CV/(<i>Ae. aegypti</i> / adultos)	-	6,185	2	0,045	0,05	$p_1 < \alpha$; RH ₀
	11,090	11,090	3	0,011	0,05	$p_2 < \alpha$; RH ₀
<i>F. vulgare</i> CV/(<i>An. arabiensis</i> / adultos)	-	12,008	2	0,002	0,05	$p_1 < \alpha$; RH ₀
	11,090	11,090	3	0,011	0,05	$p_2 < \alpha$; RH ₀

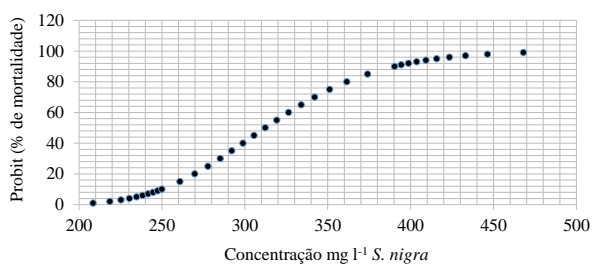
NRH₀: não se rejeita a hipótese nula; RH₀: rejeita-se a hipótese nula; CV- Cabo Verde; Port- Portugal; L₃- Larvas do 3º estágio. p_1 -grau de significância do teste de Pearson; p_2 - grau de significância do teste Verossimilhança do Qui Quadrado.



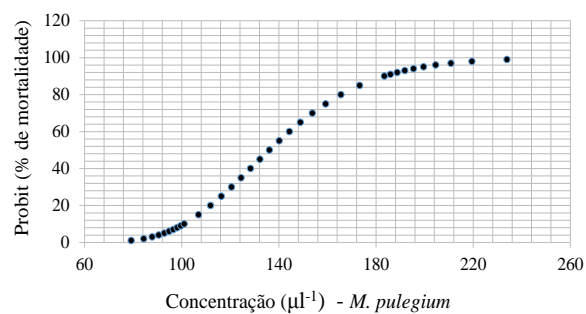
a1)



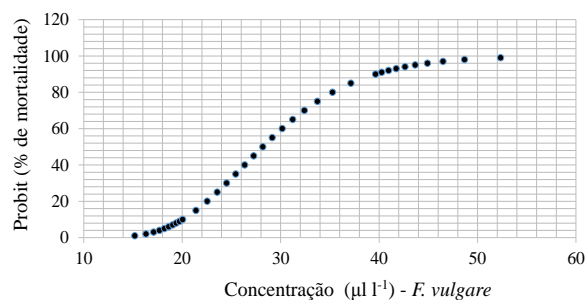
b1)



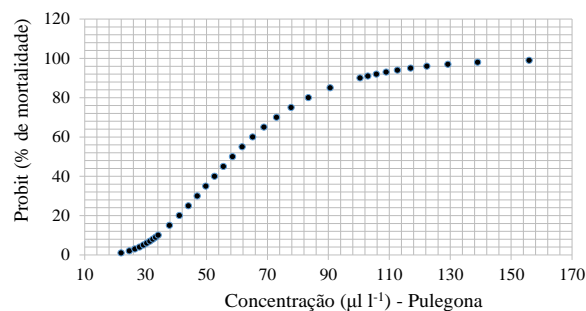
a2)



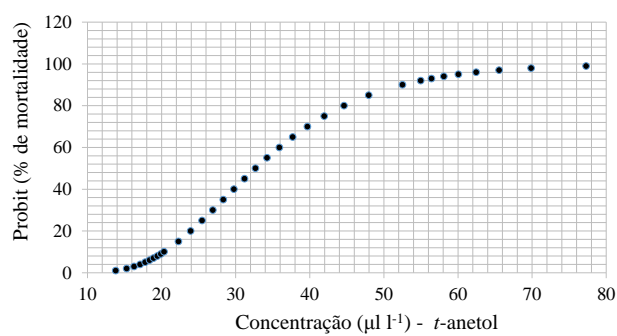
b2)



a3)



b3)



c)

Figura 21 - Curva dose-mortalidade de plantas de Portugal (a) e de Cabo Verde (b) e *trans*-anetol (c) em *Ae. aegypti*.

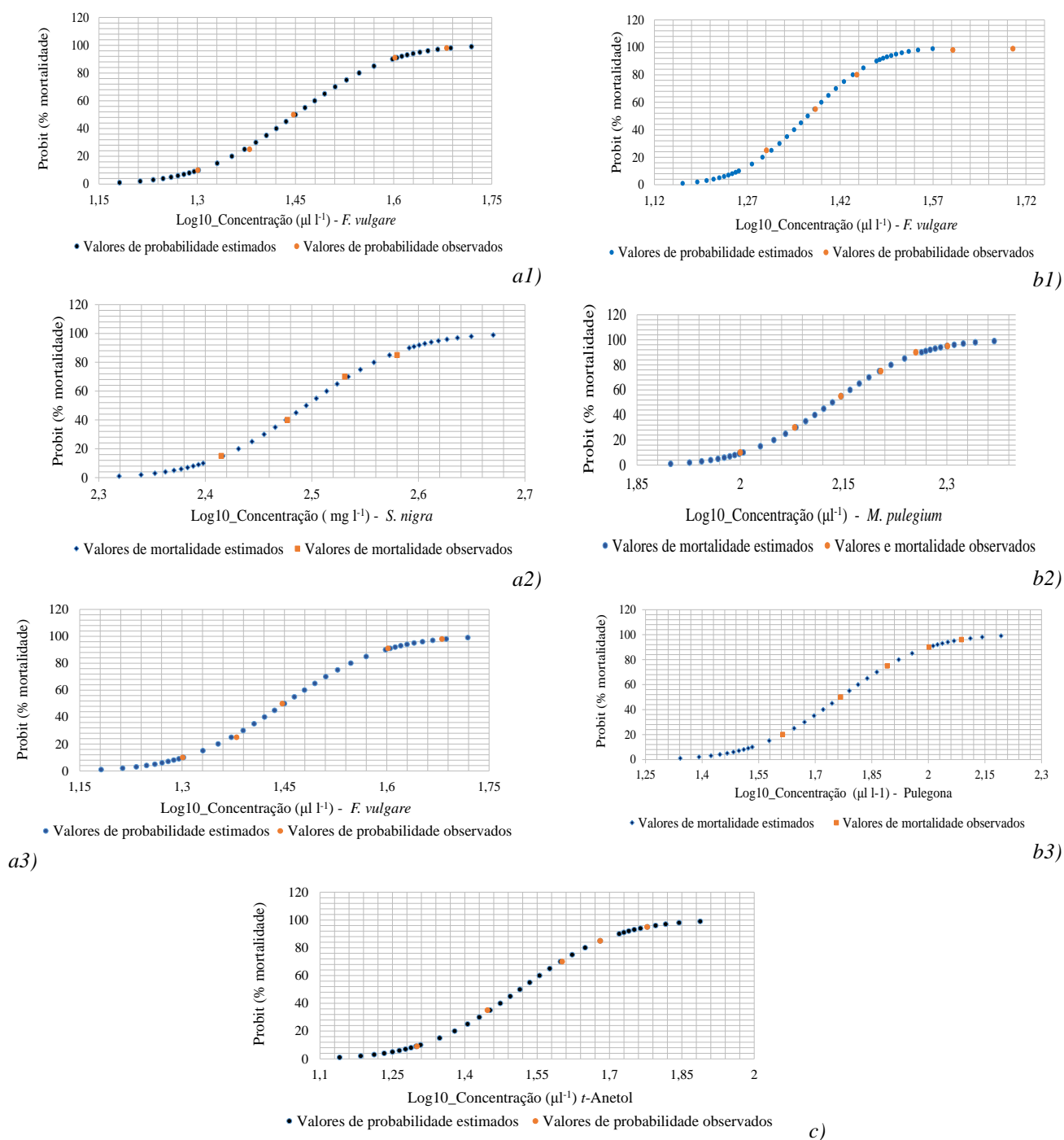
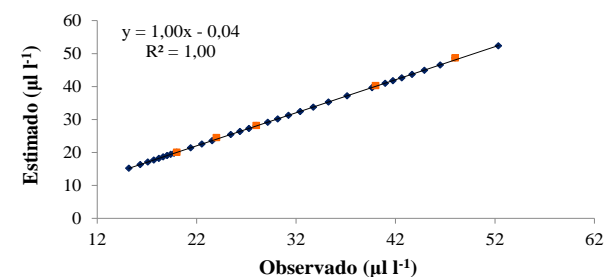
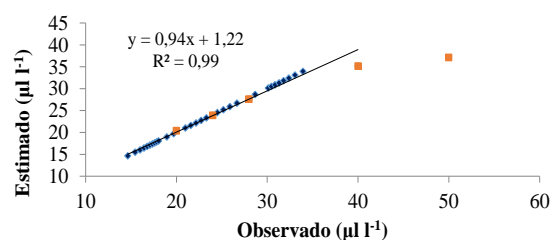
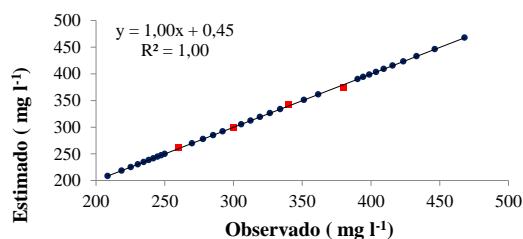
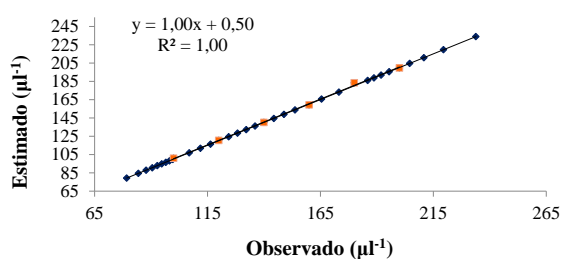
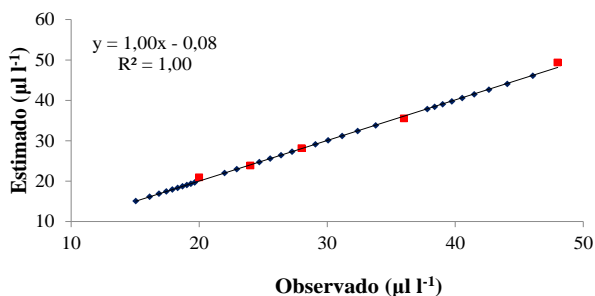
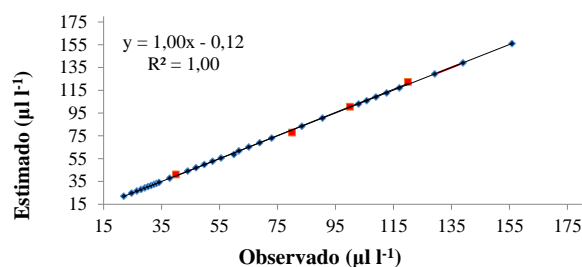


Figura 22 - Curva dose-mortalidade observada e estimada. Plantas de Portugal (a) e de Cabo Verde (b) e *trans*-anetol (c) em *Ae. aegypti*.

a1 - *F. vulgare*b1 - *F. vulgare*a2 - *S. nigra*b2 - *M. pulegium*a3 - *F. vulgare* em *An. arabiensis*

b3 - pulegona

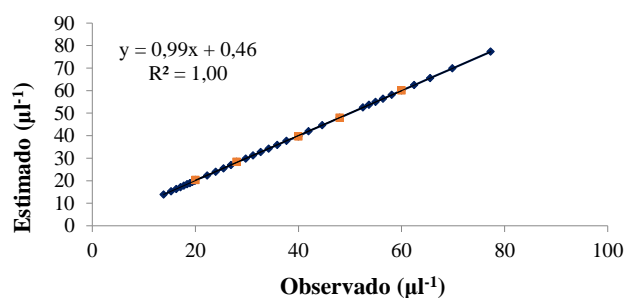
c - *trans*_Anetol

Figura 23 - Valores de R^2 obtidos na regressão entre as concentrações observadas e estimadas. Portugal (a) e Cabo verde (b). a1- OE (μL^{-1}) de *F. vulgare*; a2 - extrato (em mgL^{-1}) de *S. nigra* (ambos em *Ae. aegypti* / L_3); a3 - OE de *F. vulgare* em *An. arabiensis* / L_3 ; b1 - *F. vulgare*; b2 - *M. pulegium*; b3 - pulegona e c - *trans*-anetol (os últimos em *Ae. aegypti* / L_3).

IV.7.1. Bioensaios larvicidas com os extratos do *Sambucus nigra* em acetato de etilo

Sambucus nigra encontra-se descrito na literatura, como sendo uma planta com propriedade medicinal, no tratamento de doenças inflamatórias e reumatóides devido à presença de alcalóides nomeadamente da sambucina, sendo referida também como um bom diurético devido a presença de flavonóides (Ponessa *et al*, 2001), contudo existem poucas referências quanto à sua ação inseticida nos Culicídeos.

Em estudos recentes foi constatado o efeito larvicida em *An. atroparvus* e em *Ae. aegypti* do Arquipélago da Madeira (Rocha *et al*, 2008), pelo que tornou-se pertinente a inclusão desta planta neste estudo.

Foram efetuados testes de sensibilidade às larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti*, com extratos etanólico (ETOH) e acetato de etilo (EtOAc) de *S. nigra*, mas apenas os últimos revelaram efeito larvicida, tendo sido determinadas as doses letais mínimas que eliminam 50, 90 e 99 % da população (Tabela 16). A mortalidade de 8 % observada no grupo controlo foi corrigida com a fórmula de Abbott.

Tabela 16 - Atividade do extrato em acetato de etilo (EtOAc) de *S. nigra* no 3º estágio das larvas de *Ae. aegypti*, 24 horas após o contacto.

Concentração letal (mgL ⁻¹) (Intervalo de confiança 95%)	
CL ₅₀	312,4 (304,7-320,0)
CL ₉₀	390,3 (375,1-412,2)
CL ₉₉	468,0(438,6-513,4)
Equação da reta	13,2*x+-33,2
R ²	0,998

R²-Coeficiente de correlação

O teste de Pearson para determinação do ajustamento da reta determinada aos resultados obtidos permitiu concluir por um bom ajustamento da mesma (Qui-Quadrado=0,222,

$gl=2$ e $p=0,895$ (Anexo VII.1 e Figura VII.1). Os resultados obtidos através do programa SPSS incluem ainda o cálculo dos intervalos de confiança para a dose, ou o seu logaritmo de base 10, associadas das percentagens de mortalidade entre 0,01 e 99,0%, (Anexo VII.2).

Tratando-se de um extrato bruto, isto é, que não foi submetido ao fracionamento e purificação, as concentrações letais obtidas foram muito baixas. Verifica-se que as doses mínimas necessárias para matar 50% e 90% das larvas foram de, respetivamente, $304,7 \text{ mgL}^{-1}$ e $389,9 \text{ mgL}^{-1}$, pelo que se considera que esta população é sensível ao extrato de *S. nigra* (EtOAc). Verifica-se que as concentrações letais obtidas confirmam a ação larvicida observada em estudos anteriores (Rocha *et al.*, 2008), efetuados com larvas de *Ae. aegypti* do Arquipélago da Madeira ($LC_{50}=350 \text{ mgL}^{-1}$ e $LC_{90}=1940 \text{ mgL}^{-1}$). Comparando os resultados da quantificação dos parâmetros letais, a população de Cabo Verde parece ser mais sensível ao extrato do *S. nigra* que a da Madeira. Este resultado vem confirmar o referido por Sukumar *et al.*, 1991, que as características genéticas dos mosquitos podem contribuir, entre outros fatores para a variação de respostas dos mesmos quando expostos aos fitoquímicos. *Aedes aegypti* foi introduzido na Madeira em 2005, provavelmente oriunda da América latina (Seixas, 2012), e em Cabo Verde foi assinalada a sua presença pela primeira vez por Sant'Anna em 1931 (citado por Ribeiro *et al.*, 1980), proveniente do continente africano, sendo, assim, de admitir que a diferente origem das populações possa justificar, ou contribuir para, as diferenças de sensibilidade observadas.

IV.7.2. Bioensaios larvicidas com óleos essenciais de *M. pulegium* e *F. vulgare*

Nos bioensaios de larvicidas, e de acordo com as normas preconizadas pela Organização Mundial de Saúde, o registo da mortalidade é efetuado 24h após contato com o produto testado. No entanto, no caso do óleo essencial de *F. vulgare*, foi observada a ocorrência de mortalidade larvar 3 horas após a exposição. Atingiu-se, aproximadamente, 100% de mortalidade das larvas de *Ae. aegypti* com $52,4 \mu\text{L}^{-1}$ do óleo de funcho de origem portuguesa comparativamente aos $37,1 \mu\text{L}^{-1}$ do funcho de origem cabo-verdiana (Tabela 17). Este resultado confirmou os efeitos larvicidas do

óleo essencial de *F. vulgare* referidos por Chung *et al.*, 2011, que obtiveram efeito tóxico considerável com esta mesma planta em larvas do 4º estágio de *Ae. aegypti* com CL₅₀ de 41,23ppm e CL₉₀ de 65,20ppm. Para ambas as plantas não houve mortalidade nos grupos controle.

Existem várias referências à atividade biocida de extratos de *F. vulgare* contra diferentes espécies de insetos e ácaros (Mimica-Dukić *et al.*, 2003). Trabalhos anteriores, que avaliaram as propriedades larvicidas do óleo essencial de *F. vulgare*, verificaram que uma concentração de 40 mgL⁻¹ causava 50% de mortalidade em larvas do segundo estágio de *Culex pipiens*, 2 horas após o contato, enquanto que uma concentração de 60 mgL⁻¹ e após 4 h de exposição, causava 90% de mortalidade em larvas de 4º estágio da mesma espécie (Zoubiri *et al.*, 2011).

Tabela 17 - Efeito larvicida dos óleos essenciais de *F. vulgare* e *M. pulegium* em larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti*, 24 horas após contacto.

Concentração Letal	Efeito larvicida de óleo essencial			
	Concentração, µL ⁻¹ (Intervalo de confiança 95%)			
	<i>F. vulgare</i> Cabo Verde	<i>F. vulgare</i> Portugal	<i>M. pulegium</i> Cabo Verde	<i>M. pulegium</i> Portugal
CL ₅₀	23,3 (22,6-24,0)*	28,2 (27,2-29,3)	136,1(132,1-140,0)	107,3 (92,6-112,5) ^α
CL ₉₀	30,1(28,7-32,3)	39,6 (37,5-42,6)	183,4(176,1-192,8)	155,0 (131,4-236,8)
CL ₉₉	37,1 (34,2-41,8)	52,4 (48,0-58,7)	223,9 (219,1-254,4)	209,3 (163,1-428,3)
Equação da reta	11,07x +(-15,14)	9,38x+ (-12,5)	9,85x+(-21,02)	6,96x+(-14,19)
R ²	0,999	0,983	0,995	0,921

*equivale aproximadamente a 4,4 mgL⁻¹ e 93,2 ppm e ^α 20,1 mgL⁻¹

Os resultados obtidos comprovam ainda efeito larvicida de OE de *M. pulegium* de Portugal (CL₉₉-209,3 µL⁻¹) e de Cabo-Verde (CL₉₉-223,96 µL⁻¹).

Os efeitos inseticidas dos OEs de *M. pulegium* contra mosquitos foram também referidos por Michaelakis *et al.* (2011), num estudo em que foi avaliado o efeito desta planta em larvas do *Culex pipiens*, tendo sido obtida CL₅₀ de 46,97 mgL⁻¹. Também é conhecida a aplicação do óleo desta planta no controlo de outros grupos de insetos (Conceição *et al.*, 2010).

A OMS não estipula nenhum critério de classificação para potenciais larvicidas; alguns autores utilizam os valores da concentração letal mínima que elimina 50% da população (CL_{50}) como critério de atividade, mais especificamente, se $CL_{50} < 50 \text{ mgL}^{-1}$ o produto é considerado muito ativo, se $50 < CL_{50} < 100 \text{ mgL}^{-1}$ o produto é considerado ativo, e quando $CL_{50} > 750 \text{ mgL}^{-1}$ o produto é considerado inativo (Chantraint *et al*, 1998; Komalamisra *et al*, 2005; Magalhães *et al*, 2010; Masscho *et al*, 2009). Considerando que a planta com atividade mais elevada no presente estudo, *F. vulgare* (Cabo Verde) apresenta CL_{50} igual a $23,3 \mu\text{L}^{-1}$, aproximadamente $4,4 \text{ mgL}^{-1}$, considera-se, segundo estes critérios, o OE desta planta com elevado potencial larvicida.

No caso de *An. arabiensis* foi grande a dificuldade no estabelecimento de uma colónia, tendo-se revelado difícil e morosa a produção suficiente de indivíduos para se efetuarem os ensaios previstos. Assim optou-se por fazer bioensaios larvares somente com OE de *F.vulgare*, visto tratar-se da espécie vegetal que nos ensaios de otimização das concentrações, revelou maior atividade larvicida. Em termos de concentrações letais obtidas para ocorrência de 50, 90 e 99 % de mortalidade observaram-se pequenas diferenças com a aplicação dos OEs de *F.vulgare* de Cabo Verde e de Portugal. No entanto é necessária realização de maior número de réplicas, de modo a avaliar se as diferenças de atividade observadas entre as duas plantas são efetivamente significativas (Figura 24, Tabela 18).

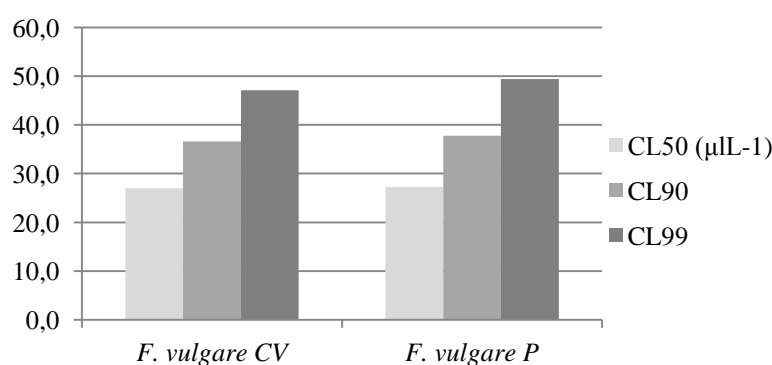


Figura 24 - Comparação da atividade larvicida dos OEs de *F. vulgare* Cabo Verde (CV) e de Portugal (P) em larvas de *An. arabiensis*.

Tabela 18 - Atividade larvicida do OE de *F. vulgare* de Cabo Verde e Portugal em *An. arabiensis*, 24 horas após a exposição.

Concentração letal (μL^{-1})	Atividade larvicida de OEs	
	<i>F. vulgare</i> Cabo Verde	<i>F. vulgare</i> Portugal
CL ₅₀	27,0 (24,0-30,4)	27,3 (25,2-29,6)
CL ₉₀	36,6 (32,0-50,7)	37,8 (34,0-45,9)
CL ₉₉	47,1 (38,4-81,2)	49,4 (41,8-68,1)
Equação da reta	9,5x+(-13,6)	8,5x+(-12,3)
R ²	0,948	0,979

IV.7.3. Bioensaios larvicidas com os compostos ativos dos óleos essenciais de

M. pulegium e *F. vulgare*

Após identificação dos compostos maioritários dos OEs das duas plantas (*F. vulgare* e *M. pulegium*) foi avaliada a atividade larvicida de alguns dos seus compostos, nomeadamente *trans*-anetol, estragol, (-)-limoneno, (+)-limoneno, pulegona e mentona. Os resultados da análise da atividade dos OEs destas plantas, e dos seus constituintes, sobre as larvas de *Ae. aegypti* evidenciam as propriedade larvicidas daqueles e a existência de efeitos sinergistas entre vários dos constituintes ativos (Figura 25), mais evidentes nos casos do *trans*-anetol e estragol.

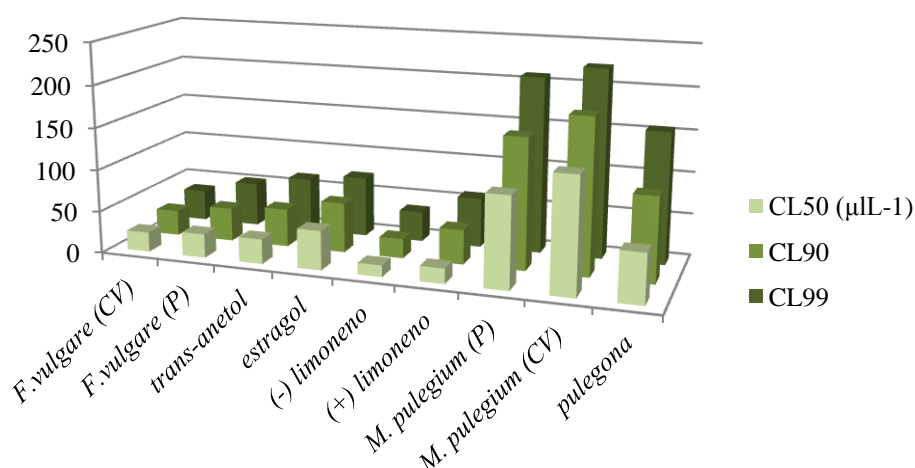


Figura 25 - Comparação da atividade larvicida dos OEs de *F. vulgare* e da *M. pulegium* de Cabo Verde (CV) e de Portugal (P) e dos respectivos compostos ativos nas larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti*.

O gráfico mostra que, comparativamente aos OEs brutos, são necessários em alguns dos compostos (L-limoneno e pulegona) menores volumes para se obter 50, 90 e 99% de mortalidade das larvas de *Ae. aegypti* (Tabelas 17 e 19).

No caso de *M. pulegium* constatou-se que a elevada atividade larvicida da pulegona, um dos seus compostos maioritários, é consentânea com a atividade do respetivo OE bruto, ou seja com um CL₅₀ de 58,5 µL⁻¹ versus um CL₅₀ 107,3 µL⁻¹. Os ensaios larvicidas com mentona, um dos compostos maioritários de *M. pulegium* mostraram que, apesar de se terem usado doses muito elevadas (500 µL⁻¹), não se observou mortalidade. Efetivamente as larvas foram afetadas, mas permaneceram em estado de letargia, durante 24 horas, não ocorrendo morte nem reanimação das mesmas ao fim de 48 horas, o que pressupõe a existência de uma atividade biológica da mentona distinta da pulegona.

Tabela 19 - Atividade larvícida dos compostos ativos de *F. vulgare* (a) e de *M. pulegium* (b).

Concentração letal (μL^{-1})	Atividade larvícida dos compostos (Intervalo de confiança 95%)				
	(-)-limoneno ^a	(+)-limoneno ^a	<i>trans</i> -anetol ^a	estragol ^a	pulegona ^b
CL ₅₀	13,0 (10,5-16,7)	17,8 (12,8-23,2)	29,3 (28,0-30,6)	46,4 (42,5-50,0)	58,5 (48,3-67,3)
CL ₉₀	23,2 (18,8-36,0)	41,0 (25,5-69,7)	45,2 (42,5-48,8)	59,1 (54,2-69,6)	100,4 (85,1-136,9)
CL ₉₉	35,7 (26,1-77,3)	59,1 (38,2-197,7)	64,3 (58,2-73,3)	72,1 (63,3-95,3)	155,9 (119,8-275,8)
Equação da reta	5,3x+ (-6,1)	4,1x+ (-5,2)	7,6x (-10,4)	11,1x+ (-18,5)	6,5x+(-11,0)
R ²	0,972	0,968	0,981	0,972	0,999

IV.7.4. Bioensaios adulticidas com óleo essencial de *F. vulgare*

Efetuar-se-iam testes de sensibilidade, em formas adultas de *Ae. aegypti*, aos óleos essenciais de *F. vulgare* de Cabo Verde e Portugal e, em formas adultas de *An. arabiensis*, ao OE de *F. vulgare* de Cabo Verde, sendo os resultados preliminares, por não ter havido mosquitos em quantidade suficiente para fazer as réplicas necessárias (N=75-100). Na Tabela 20 são apresentadas as doses letais mínimas para eliminar 50, 90 e 99% dos exemplares, sendo as doses expressas em percentagem de óleo-emulsão aplicadas num papel de filtro com 180 cm² de área de contacto. A emulsão foi preparada em Tween[®]20 a 0,04% e no grupo controlo os papéis de filtro foram impregnados apenas com uma solução aquosa de Tween[®]20 (tensioativo). Os mosquitos estiveram em contacto com o produto testado durante uma hora e a monitorização das mortalidades foi efetuada ao fim de 24 horas, contudo foi observado que após 10 minutos de exposição todos os mosquitos tombaram, com a exceção do tubo controlo. Ao fim de 24 horas, quando se registaram as mortalidades observou-se reanimação dos mosquitos tombados de uma forma gradual, demonstrando um efeito de dose dependência.

Tabela 20 - Atividade do OE de *F. vulgare* em mosquitos adultos de *Ae. aegypti*, (a) e em *An. arabiensis* (b).

Concentração letal (%)	Atividade adulticida (Intervalo de confiança 95%)		
	<i>F. vulgare</i> ^a Cabo Verde	<i>F. vulgare</i> ^a Portugal	<i>F. vulgare</i> ^b Cabo Verde
CL ₅₀	1,7 (0,7-2,2)	2,4 (0,6-3,1)	1,5
CL ₉₀	2,8 (2,2-6,8)	3,3 (2,7-294,5)	2,7
CL ₉₉	4,2 (3,0-31,2)	4,3 (3,2-...)	4,3
Equação da reta	5,3x+(-1,2)	11,0x+(-4,1)	5,3x+(-0,9)
R ²	0,980	0,900	0,912

IV.7.5. Tratamento estatístico dos bioensaios larvicidas e adulticidas

IV.7.5.1 Análise estatística da atividade larvicida

Para avaliar a normalidade de distribuição das variáveis em estudo (mortalidade *versus* concentração) foram utilizados os testes de Kolmogorov-Sminorv e Shapiro-Wilk. Os dois testes averiguam a hipótese de que os dados apresentam uma distribuição normal. No caso de amostras menores que 50 indivíduos, o teste Shapiro-Wilk é mais robusto. Um valor p inferior à significância (α) indica um desvio na distribuição dos dados em relação à curva Normal.

Na Tabela 21 apresentam-se os resultados que englobam a estatística descritiva e os testes de Normalidade para as diferentes percentagens de mortalidade de mosquitos observadas, face às aplicações de concentrações (doses) obtidas das plantas em estudo. Os resultados dos testes demonstraram que as percentagens da mortalidade dos mosquitos seguem uma distribuição normal, face às concentrações aplicadas, tanto dos OEs brutos como dos respetivos compostos ativos.

Tabela 21 - Análise estatística da atividade larvicida face às doses aplicadas dos OEs das espécies vegetais em estudo. Testes de Normalidade.

<i>Ae. aegypti</i> /L ₃		<i>F. vulgare</i>		<i>M. pulegium</i>		<i>S. nigra</i>	Estragol	<i>t</i> -anetol
		CV	P	CV	P	P	CA ¹	CA ¹
Estatística Descritiva	N	250	250	200	200	200	200	200
	x	71,7	43,6	58,7	50,0	52,3	61,6	58,6
	Md	80,5	37,5	64,5	41,5	53,8	76,1	64,0
	s	3,3	3,4	3,4	3,5	3,2	3,8	3,6
	Sk.	-0,941	0,925	-0,431	0,498	-0,155	-0,511	-0,358
	Ku.	-0,214	0,667	-1,695	-1,382	-1,685	-2,350	-1,753
Testes de Normalidade	Teste	0,206	0,213	0,224	0,178	0,178	0,249	0,176
	K-S	g.l. 5	g.l. 5	g.l. 6	g.l. 6	g.l. 4	g.l. 5	g.l. 5
		p=0,200	p=0,200	p=0,200	p=0,200	p=0,000	p=0,200	p=0,200
	Teste	0,892	0,924	0,922	0,938	0,984	0,900	0,952
	S-W	g.l.= 5	g.l.= 5	g.l. 6	g.l. 6	g.l. 4	5	5
		p=0,369	p=0,557	p=0,519	p=0,641	p=0,926	P=0,410	P=0,749

CV: Cabo Verde; **P:** Portugal; **CA¹:** compostos ativos de *F. vulgare*.; **N:** número de observações; **X:** Média; **Md:** Mediana; **s:** Desvio padrão. **Sk.:** skewness. **Ku.:** kurtosis. **K-S:** Kolmogorov-Smirnov's com correção de "Lilliefors significance2; **S-W:** Shapiro-Wilk;

Uma vez que foram satisfeitos os requisitos da independência e da normalidade das mortalidades (variáveis quantitativas dependentes) dos mosquitos causadas pelas concentrações (ou doses) das diferentes plantas, aplicou-se a tais mortalidades os testes paramétricos nomeadamente o teste *t* de Student para amostras independentes, que permite avaliar a hipótese de igualdade ou diferenças entre duas médias e o teste ANOVA, que permite comparar a variabilidade das médias de todas as amostras com a variabilidade intrínseca das amostras.

Por uma questão de rigor, sem desprezar os resultados do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, optou-se nas amostras em que a normalidade não foi comprovada ($p < \alpha$), por considerar o teste de Mann-Witney, que é uma alternativa não paramétrica usada para a comparação de variáveis ordinais ou quantitativas entre dois grupos independentes, quando a distribuição não é simétrica (normal). Considerou-se ainda o teste de Kruskal-Wallis, que é uma alternativa não paramétrica para a análise de variância, usado para comparar amostras independentes.

Na Tabela 22 resumem-se os resultados da aplicação dos testes paramétricos, e na Tabela 23 os resultados dos testes não paramétricos.

No caso da aplicação do teste *t*-student (Tabela 22) verifica-se que $p > \alpha$ (0,05) para todas as mortalidades observadas com aplicação de diferentes concentrações de OEs extraídas das espécies vegetais testadas. Pelo que se rejeita a hipótese nula (de igualdade de variâncias), ou seja não há uma diferença estatisticamente significativa entre as médias da mortalidade conseguida com as doses de plantas de Cabo Verde e Portugal, nomeadamente entre:

- *S. nigra* e *F. vulgare* de Portugal,
- OE brutos e os respetivos compostos ativos,
- OE de *F. vulgare* aplicados em larvas de *An. arabiensis*;
- Mosquitos adultos de diferentes espécies (*Ae. aegypti* e *An. arabiensis*) ou da mesma espécie expostos a diferentes produtos.

No caso da aplicação do teste de Levene (Tabela 22), verifica-se que $p > 0,05$, pelo que se aceita H_0 , que mostra a igualdade de variâncias entre os grupos. Podendo afirmar-se, então, que a potencialidade de causar mortalidade nos mosquitos é aproximadamente igual entre os grupos anteriormente referidos, não se registando diferenças significativas.

Relativamente à ANOVA verificam-se valores de significância altos indicando também que não há diferenças significativas entre as médias dos grupos (Tabela 22).

Tabela 22 - Análise estatística da atividade larvicida face às concentrações aplicadas dos OEs das espécies vegetais em estudo.

Teste paramétricos	Espécies de plantas e os compostos ativos				
	<i>F. vulgare</i>	<i>M. pulegium</i>	<i>S. nigra</i>	estragol	<i>t</i> -anetol
t-Student	0,754	-0,431	0,876	0,450	0,601
Amostras independentes	g.l. = 8 p = 0,473	g.l. = 10 p = 0,676	g.l. 7 p=0,410	g.l. 8 p ^{**} =0,664	g.l. 8 p ^{**} =0,565
Teste Levene	0,340	0,005	0,006	0,464	0,095
	g.l. ₁ =1; g.l. ₂ =8 p=0,576	g.l. ₁ =1; g.l. ₂ =10 p=0,943	g.l. ₁ =1 g.l. ₂ =7 p=0,940	g.l. ₁ =1; g.l. ₂ =8 p ^{**} =0,515	g.l. ₁ =1; g.l. ₂ =8 p ^{**} =0,766
ANOVA	F=568 P=0,473	F=0,186 p=,676	0,768 0,410	F=0,203 p ^{**} =0,664	F=0,361 p ^{**} =0,565

p^{**}: CA¹/FvCV; CA¹: compostos ativos do *F. vulgare*

Portanto, podemos dizer que a potencialidade de causar mortalidade aos mosquitos não é significativamente diferente entre os grupos em análise.

Com o teste de Mann-Witney pretende-se a comparação da mediana da mortalidade, causada por diferentes plantas. Como resultado da aplicação deste teste constata-se também que não há diferença significativa na mediana de mortalidade dos mosquitos expostos a concentrações de OE/extrato ou composto ativo de uma mesma planta, mas com origem geográfica distintas. O valor de p em todos os casos é maior que α (Tabela 23).

Pretendeu-se com o teste H de Kruskal Wallis analisar a variância da mortalidade dos mosquitos causada pelas diferentes concentrações aplicadas. Neste caso está-se a comparar dois grupos, daí os resultados serem muitos semelhantes ao do teste de Mann-Whitney.

Verifica-se a partir dos resultados deste teste que $p > \alpha$ (Tabela 23) em todos os casos analisados. Assim, não há evidências para se concluir que existam diferenças significativas nas variâncias da mortalidade dos mosquitos expostos a concentrações de OE/ extrato ou composto ativo de uma mesma planta, mas com origem geográfica distintas.

Tabela 23 - Análise estatística da atividade larvica face às doses aplicadas dos OEs das espécies vegetais em estudo.

Teste paramétricos	Espécies vegetais e Compostos ativos				
	<i>F. vulgare</i>	<i>M. pulegium</i>	<i>S. nigra</i>	estragol (CA ¹)	<i>trans</i> -anetol (CA ¹)
Mann-Whitney U Wilcoxon W	9,000	15,000	6,000	10,500	9,000
	24,000	36,000	16,000	25,500	25,500
	p=0,548	p=0,699	P=0,413	p ^{**} =0,690	p ^{**} =0,690
Kruskal-Wallis	$\chi^2=0,535$	$\chi^2=0,231$	$\chi^2=0,960$	$\chi^2=0,176$	$\chi^2=0,535$
	g.l. 1	g.l. 1	g.l. 1	g.l. 1	g.l. 1
	p=0,465	p=0,631	p [*] =0,327	p ^{**} =0,675	p ^{**} =0,465

p^{*}: *S. nigra* P / *F. vulgare* P; p^{**}:CA¹/*F. vulgare* CV; CA¹: compostos ativos do *F. vulgare*.

Os mesmos testes estatísticos foram efetuados para as atividade larvica e adultica, e para as atividades larvicidas entre diferentes espécies de insetos face às concentrações aplicadas dos OEs das espécies vegetais em estudo (Tabelas 24 e 25).

Considerando os resultados do teste de S-W, ($p > \alpha$) verifica-se que não se rejeita H_0 , ou seja, as percentagens de mortalidade dos mosquitos sob a forma larvar e adulta seguem uma distribuição normal, face às concentrações aplicadas, independentemente das espécies de mosquito em análise. Os resultados dos teste não paramétricos referidos anteriormente, apresentam-se na Tabela 25.

Tabela 24 - Análise estatística da atividade larvicida e adulticida face às doses aplicadas, dos OEs das espécies vegetais e os respectivos compostos. Estatística descritiva e testes de Normalidade.

Testes	Larvas e Adultos	(-)-limoneno <i>Ae. aegypti</i> L3	(+)-limoneno <i>Ae. aegypti</i> L3	pulegona <i>Ae. aegypti</i> L3	<i>An. arabiensis</i> L3		<i>Ae. aegypti</i> (Ad)	<i>An. arabiensis</i> (Ad)	<i>Ae. aegypti</i> (Ad)
		CA ¹	CA ¹	CA ²	FvCV	FvP	FvCV		FvP
Estatística descritiva	N	300	300	200	100	100	100	100	100
	X	63,2	58,4	72,0	56,9	56,0	77,5	56,0	74,7
	Md	72,7	61,2	80,0	43,2	46,0	85,0	54,0	77,0
	s	3,7	3,8	3,1	3,7	3,6	2,7	3,1	2,6
	Sk.	-0,813	-0,193	-0,944	0,225	0,157	-1,356	0,213	-0,407
Teste de Normalidade	Ku.	-0,500	-2,255	-0,084	-2,407	-1,901	1,663	-3,495	0,000
	K-S	0,200	0,197	0,185	0,242	0,209	0,257	0,237	0,203
	g.l.	5	5	6	5	5	4	3	3
	p	0,200	0,200	0,200	0,200	0,200	0,000	0,000	0,000
	S-W	0,933	0,935	0,895	0,902	0,944	0,894	0,934	0,994
	g.l.	5	5	6	5	5	4	3	3
	p	0,616	0,630	0,345	0,419	0,696	0,402	0,618	0,849

N: número de observações; X: Média; Md: Mediana; s: Desvio padrão. Sk.: skewness. Ku.: kurtosis. K-S: Kolmogorov-Smirnov's com correção do Lilliefors significance S-W: Shapiro-Wilk; CA¹: compostos ativos de *F. vulgare* e CA²: compostos ativos de *M. pulegium*.

Tabela 25 - Análise estatística da atividade larvicida e adulticida face às doses aplicadas, das espécies vegetais e os respectivos compostos. Teste paramétricos e não paramétricos.

Testes	Larvas e Adultos	(-)-limoneno <i>Ae. aegypti</i> L3	(+)-limoneno <i>Ae. aegypti</i> L3	pulegona <i>Ae. aegypti</i> L3	<i>An. arabiensis</i> (L3)	<i>Ae. aegypti</i> <i>An. arabiensis</i> (Ad)	<i>Ae. aegypti</i> (Ad)
		CA ¹	CA ¹	CA ²	Fv CV	Fv P	FvCV/P
Testes Paramétricos	<i>t</i> -Student Amostra independente	0,382 g.l. 8 p ^{**} =0,712	0,593 g.l. 8 p ^{**} =0,570	0,388* g.l. 9 p ^{***} =0,707	0,038 g.l. 8 p=0,971	1,043 g.l. 6 P=0,337	-0,316 g.l. 6 p=0,763
	Teste Levene	0,138 g.l. ₁ =1 g.l. ₂ =8 p ^{**} =0,720	0,202 g.l. ₁ =1 g.l. ₂ =8 p ^{**} =0,665	0,005 g.l. ₁ =1 g.l. ₂ =8 p ^{***} =0,630	0,036 g.l. ₁ =1 g.l. ₂ =8 p=0,855	0,638 g.l. ₁ =1 g.l. ₂ =6 p=0,455	1,082 g.l. ₁ =1 g.l. ₂ =6 p=0,338
	ANOVA	F=0,146 p ^{**} =0,712	F=0,351 p ^{**} =0,570	F=0,150 p ^{***} =0,707	F=0,001 p=0,971	F=1,088 p=0,337	F=0,100 P=0,763
Testes não Paramétricos	Mann-Whitney U Wilcoxon W	10,500 25,500 p ^{**} =0,690	10,500 25,500 p ^{**} =0,690	15,000 36,000 p ^{***} =0,699	12,000 27,000 P=1,000	3,500 13,500 p=0,200	7,000 22,000 p=1,000
	Kruskal-Wallis	$\chi^2=0,176$ g.l. 1 p ^{**} =0,675	$\chi^2=0,176$ g.l. 1 p ^{**} =0,675	$\chi^2=0,133$ g.l. 1 p ^{***} =0,715	$\chi^2=0,011$ g.l. 1 p=0,916	$\chi^2=1,708$ g.l. 1 p=0,191	$\chi^2=0,022$ g.l. 1 p=0,881

p^{**}: CA¹/ *F. vulgare* CV; CA¹: compostos ativos de *F. vulgare* e CA²: compostos ativos de *M. pulegium*.
p^{***}: Pulegona / *M. pulegium* CV

Ao comparar os compostos ativos: estragol, *trans*-anetol, (-)-limoneno e (+)-limoneno com o OE bruto de *F. vulgare*; pulegona e OE bruto da *M. pulegium*; extrato de *S. nigra* de Portugal e OE bruto de *F. vulgare* de Portugal; OE de *F. vulgare* de Cabo Verde e de Portugal sobre larvas de *An. arabiensis*; efeito aduítida de *Ae. aegypti* e de *An. arabiensis* quando expostos ao OE de *F. vulgare* de Cabo Verde, não se constataram diferenças estatisticamente significativas, pelos testes aplicados, embora seja notório que, para eliminar 50, 90 e 99% da população de larvas de *Ae. aegypti*, são necessárias concentrações mais baixas de OE de *F. vulgare* comparativamente ao OE de *M. pulegium* e que os compostos ativos L-limoneno e pulegona revelam maior eficiência de mortalidade, na medida em que é preciso uma dose mais baixa para os mesmos parâmetros de letalidade.

Fazendo o teste de correlação de Pearson (bi-caudal) entre as mortalidades dos mosquitos observadas em função da aplicação de diferentes concentrações testadas de OEs e compostos ativos, verifica-se que há uma correlação muito elevada (>95%) ou significativa, entre as mortalidades, para $\alpha=0.01$ e $\alpha=0.05$, realçando evidências de que não há diferenças significativas nas mortalidades observadas, em função das diferentes concentrações aplicadas.

Por outro lado, observaram-se algumas situações em que as concentrações aplicadas não têm o mesmo impacto sobre a mortalidade, sendo tal diferença observada pelos valores de coeficientes de correlação de Pearson baixa (< 95%) correspondendo a nível de significância, $\alpha<0.05$. São os casos de:

- | | |
|--|--|
| a) Mort <i>F. vulgare</i> CV/Mort <i>F. vulgare</i> P (L ₃ <i>Ae. aegypti</i>); | n) Mort estragol (L ₃ <i>Ae. aegypti</i>)/Mort <i>F. vulgare</i> CV (<i>Ae. aegypti</i> _adultos); |
| b) Mort <i>F. vulgare</i> CV (L ₃ <i>Ae. aegypti</i>)/Mort <i>F. vulgare</i> CV (L ₃ <i>An. arabiensis</i>); | o) Mort <i>trans</i> -anetol (L ₃ <i>Ae. aegypti</i>)/Mort <i>F. vulgare</i> CV (L ₃ <i>An. arabiensis</i>); |
| c) Mort <i>F. vulgare</i> CV(L ₃ <i>Ae. aegypti</i>) /Mort <i>F. vulgare</i> P (L ₃ <i>An. arabiensis</i>); | p) Mort <i>trans</i> -anetol (L ₃ <i>Ae. aegypti</i>)/Mort <i>F. vulgare</i> CV(<i>Ae. aegypti</i> _adultos); |
| d) Mort <i>F. vulgare</i> P/Mortpulegona (L ₃ <i>Ae. aegypti</i>); | q) Mort (-)-lim (L ₃ <i>Ae. aegypti</i>) /Mort <i>F. vulgare</i> CV (L ₃ <i>An. arabiensis</i>); |
| e) Mort <i>F. vulgare</i> P/Mort estragol (L ₃ <i>Ae. aegypti</i>); | r) Mort (-)-lim (L ₃ <i>Ae. aegypti</i>)/Mort <i>F. vulgare</i> P (L ₃ <i>An. arabiensis</i>); |
| f) Mort <i>F. vulgare</i> P/Mort (-)-limoneno (L ₃ <i>Ae. aegypti</i>); | s) Mort (+)-lim (L ₃ <i>Ae. aegypti</i>)/Mort <i>F. vulgare</i> CV (L ₃ <i>An. arabiensis</i>); |

g) <i>MortF. vulgare</i> P (<i>L₃ Ae. aegypti</i>)/ <i>Mort F. vulgare</i> CV (<i>Ae. aegypti_adultos</i>);	t) <i>Mort (+)-lim</i> (<i>L₃ Ae. aegypti</i>)/ <i>Mort F. vulgare</i> CV (<i>Ae. aegypti_adultos</i>);
h) <i>MortM. pulegium</i> P (<i>L₃ Ae. aegypti</i>)/ <i>Mort F. vulgare</i> CV (<i>Ae. aegypti_adultos</i>);	u) <i>Mort F. vulgare</i> CV (<i>L₃ An. arabiensis</i>)/ <i>Mort F. vulgare</i> CV(<i>Ae. aegypti_adultos</i>);
i) <i>MortM. pulegium</i> CV(<i>L₃ Ae. aegypti</i>)/ <i>Mort F. vulgare</i> CV (<i>Ae. aegypti_adultos</i>);	v) <i>MortF. vulgare</i> CV (<i>L₃ An. arabiensis</i> / <i>Mort F. vulgare</i> P (<i>Ae. aegypti_adultos</i>);
j) <i>MortS. nigra</i> P (<i>L₃ Ae. aegypti</i>)/<i>MortF. vulgare</i> CV (<i>L₃ An. arabiensis</i>);	w) <i>Mort F. vulgare</i> P (<i>L₃ An. arabiensis</i>)/ <i>Mort F. vulgare</i> CV (<i>An. arabiensis_adultos</i>);
k) <i>Mort pulegona</i> (<i>L₃ Ae. aegypti</i>)/ <i>Mort F. vulgare</i> P (<i>L₃ An. arabiensis</i>);	x) <i>Mort F. vulgare</i> P (<i>L₃ An. arabiensis</i>) / <i>Mort F. vulgare</i> CV(<i>Ae. aegypti_adultos</i>);
l) <i>Mort estragol</i> (<i>L₃ Ae. aegypti</i>)/ <i>Mort F. vulgare</i> CV (<i>L₃ An. arabiensis</i>);	y) <i>MortF. vulgare</i>CV(<i>An. arabiensis_adultos</i>)/<i>MortF. vulgare</i>CV(<i>Ae. aegypti_adultos</i>);
m) <i>Mort estragol</i> (<i>L₃ Ae. aegypti</i>)/ <i>Mort F. vulgare</i> P (<i>L₃ An. arabiensis</i>);	z) <i>MortF. vulgare</i> CV (<i>Ae. aegypti_adultos</i>)/<i>MortF. vulgare</i> P (<i>Ae. aegypti_adultos</i>);

Os resultados podem ser analisados a partir da Tabela 26.

Nos resultados da aplicação do teste de correlação de Pearson (bi-caudal), encontram-se realçadas em negrito as alíneas:

- a) que confirma que as concentrações aplicadas dos OEs de *F. vulgare* de Cabo Verde e Portugal evidenciaram diferenças de impacto na mortalidade de larvas de *Ae. aegypti*.
- e; f) de igual modo os compostos ativos estragol e (-)-limoneno apresentaram maior impacto na eficiência de mortalidade comparativamente ao OE de *F. vulgare* de Portugal.
- b) OE de *F. vulgare* de Cabo Verde revelou um impacto na mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* comparável ao causado em *Anopheles arabiensis*.
- y) relativamente ao efeito sobre adultos o OE de *F. vulgare* de Cabo Verde, apresentou ligeiras diferenças na mortalidade causada em *Ae. aegypti* e em *An. arabiensis*, embora estes ensaios tenham sido efetuados com um número reduzido de exemplares.
- z) OEs de *F. vulgare* de Cabo Verde e de Portugal apresentaram diferenças de impacto na mortalidade para *Ae. aegypti* adultos.

A Tabela 26 mostra elevada correlação entre a atividade larvicida do óleo essencial de *F. vulgare* de Cabo Verde e (-)-limoneno, bem como esta planta e a pulegona, o que confirma sua elevada potencialidade larvicida.

Tabela 26 - Coeficiente de regressão de Pearson e nível de significância (α) (2-tailed), entre as mortalidades em função das diferentes concentrações de compostos ativos e extratos vegetais estudados (*-0,05; **-0,01).

	Teste de correlação	MortFvCV	MortFvP	MortMpP	MortMpCV	MortSnP	MortPul	Mort_estragal_aedes	Mort_trans anetol_aedes	Mort_(-)-lim	Mort_(+)-Lim	Mort_FvCV_ara	Mort_FvP_ara	MortFvCVad_ara	MortFvCVad_aed	MortFvPad_aed
MortFvCV	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	<i>1</i>	,938 ,062	,989* ,011	,974* ,026	,994** ,006	1,000** ,000	,968* ,032	,989* ,011	1,000** ,000	,972* ,028	,913 ,087	,945 ,055	,962* ,038	,978* ,022	,983* ,017
MortFvP	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	<i>1</i>		,978* ,022	,992** ,008	,962* ,038	,928 ,072	,923 ,077	,966* ,034	,934 ,066	,982* ,018	,989* ,011	,993** ,007	,961* ,039	,856 ,144	,972* ,028
MortMpP	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)		<i>1</i>		,995** ,005	,993** ,007	,984* ,016	,955* ,045	,991** ,009	,986* ,014	,987* ,013	,963* ,037	,983* ,017	,968* ,032	,945 ,055	,989* ,011
MortMpCV	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)			<i>1</i>		,989* ,011	,968* ,032	,958* ,042	,990** ,010	,972* ,028	,995** ,005	,973* ,027	,988* ,012	,979* ,021	,911 ,089	,992** ,008
MortSnP	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)			<i>1</i>		<i>1</i>	,992** ,008	,983* ,017	,999** ,001	,994** ,006	,992** ,008	,930 ,070	,958* ,042	,985* ,015	,950 ,050	,997** ,003
MortPul	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)			<i>1</i>			<i>1</i>	,969* ,031	,986* ,014	1,000** ,000	,968* ,032	,900 ,100	,935 ,065	,959* ,041	,982* ,018	,980* ,020
Mort_estragal_aedes	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)							<i>1</i>	,987* ,013	,973* ,027	,979* ,021	,866 ,134	,900 ,100	,992** ,008	,913 ,087	,986* ,014
Mort_trans anetol_aedes	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)							<i>1</i>	<i>1</i>	,989* ,011	,996** ,004	,932 ,068	,958* ,042	,991** ,009	,937 ,063	,999** ,001
Mort_(-)-lim	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)									<i>1</i>	,972* ,028	,904 ,096	,938 ,062	,964* ,036	,978* ,022	,983* ,017
Mort_(+)-Lim	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)									<i>1</i>	<i>1</i>	,949 ,051	,968* ,032	,994** ,006	,903 ,097	,998** ,002
Mort_FvCV_ara	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)											<i>1</i>	,996** ,004	,913 ,087	,839 ,161	,936 ,064
Mort_FvP_ara	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)												<i>1</i>	,936 ,064	,882 ,118	,960* ,040
MortFvCVad_ara	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)													<i>1</i>	,888 ,112	,995** ,005
MortFvCVad_aed	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)														<i>1</i>	,923 ,077
MortFvPad_aed	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)															<i>1</i>

IV.8. Análise microscópica das larvas

O efeito inseticida de óleos essenciais pode ocorrer de diversos modos, sendo os mais comuns a mortalidade, as deformações em diferentes estádios de desenvolvimento, a repelência e a fagoinibição. Os mecanismos de ação tóxica dos óleos essenciais ainda não são bem conhecidos, no entanto, o aparecimento de sinais tóxicos são rápidos (Knaak *et al.*, 2010). As manifestações da ação tóxica dos óleos essenciais em baratas (*Periplaneta americana*), como hiperatividade, seguida por híper extensão das patas e do abdómen, imobilidade e morte, foram descritas por Enan, 2001. Alguns estudos demonstram que a octopamina induz este tipo de reações (Livingstone *et al.*, 1980; Harria-Warrick *et al.*, 1980), na medida em que desempenha um amplo espectro de funções biológicas em insetos, agindo como neurotransmissor e neuromodulador (Orchard, 1982). A octopamina é encontrada em grandes quantidades no sistema nervoso de espécies do filo Arthropoda, incluindo a classe Insecta (Robertson & Juoris, 1976; Evans, 1981; Orchard *et al.*, 1981). Também Regnault-Roger (1997) descreve que o efeito tóxico dos óleos essenciais envolve muitos fatores. Entre estes, o ponto de entrada das toxinas pode ocorrer pelas vias de inalação, ingestão e contacto, em que os óleos essenciais assumem uma ação de fumigação, por vezes fagoinibidora.

A natureza do processo de envenamento e as causas que levam à morte dos insetos, quando em contacto com um determinado inseticida são evidenciadas pelas alterações morfológicas a nível celular ou histológico. Contudo a descoberta de processos de inibição enzimática ou de alterações eletrofisiológicas no sistema nervoso dos insetos contribuíram para uma maior compreensão do modo de ação dos inseticidas. Mas dado que estes mecanismos são reversíveis, alguns investigadores consideram que as lesões bioquímicas e eletrofisiológicas, envolvidas na ação inseticida, não são causas diretas da mortalidade. Para alguns insetos, nos estádios finais da morbilidade, surge um conjunto de condições patológicas, como o desequilíbrio de substâncias químicas neuroativas da hemolinfa, falhas de funcionamento das glândulas secretoras, esgotamento de reservas citoplasmáticas e intensa desidratação, que são considerados fatores secundários na indução da morte. No entanto, essas alterações são relevantes para a irreversibilidade do estado mórbido do inseto que culmina com a morte, e do mesmo modo as alterações

histológicas visíveis o são, na medida em que elas são peculiares e consistentes com o efeito de determinados inseticidas.

No presente estudo, efetuou-se uma avaliação preliminar do modo de ação dos óleos essenciais da *M. pulegium* e *F. vulgare* e dos respectivos compostos ativos majoritários. As larvas expostas aos compostos ativos foram conservadas em álcool glicerinado 2% e grupos de cinco larvas foram montados entre lâmina e lamela em meio de Hoyer para posterior observação e comparação com as amostras do grupo controlo. Ao estereomicroscópio e ao microscópio ótico foram observadas alterações morfológicas nas papilas anais de larvas de *Ae. aegypti* em contacto com os metabolitos secundários: (+)-limoneno e (-)-limoneno (Figura 26). A acumulação de grânulos escuros ao longo do tórax e escurecimento na base de inserção das papilas anais foram observadas nas larvas em contacto com os metabolitos secundários. As larvas expostas ao (-)-limoneno apresentaram maiores danos estruturais, como destruição do tubo digestivo e extrusão do conteúdo hemolinfático. No caso das larvas expostas ao (+)-limoneno o escurecimento na base das papilas anais estendeu-se ao ápice das mesmas.

Tabassum *et al.*, 1993, efetuou um estudo de avaliação de atividade de extratos de *A. indica* em larvas de *Culex quinquefasciatus* (=fatigans), tendo observado alterações morfológicas semelhantes, nomeadamente pigmentação e alterações na cabeça e abdómen das larvas. Contudo não mencionaram o escurecimento das papilas anais.

No caso de estudo observámos alteração da coloração das papilas anais, que são órgãos que estão envolvidas no processo de osmorregulação, pelo que ao longo dos ensaios foram efetuados medições do pH das soluções, não tendo sido contudo registado alterações relevantes comparativamente ao grupo controlo. Os valores de pH na solução de teste e nos grupos controlos, tendem a ser neutros a ligeiramente ácidos (pH 6 e 7), provavelmente relacionado com a natureza do tensioativo comum aos dois meios. Teria sido importante registar a condutividade ao longo dos ensaios, mas tal não foi possível, pelo que será contemplado nos trabalhos futuros a análise deste parâmetro.

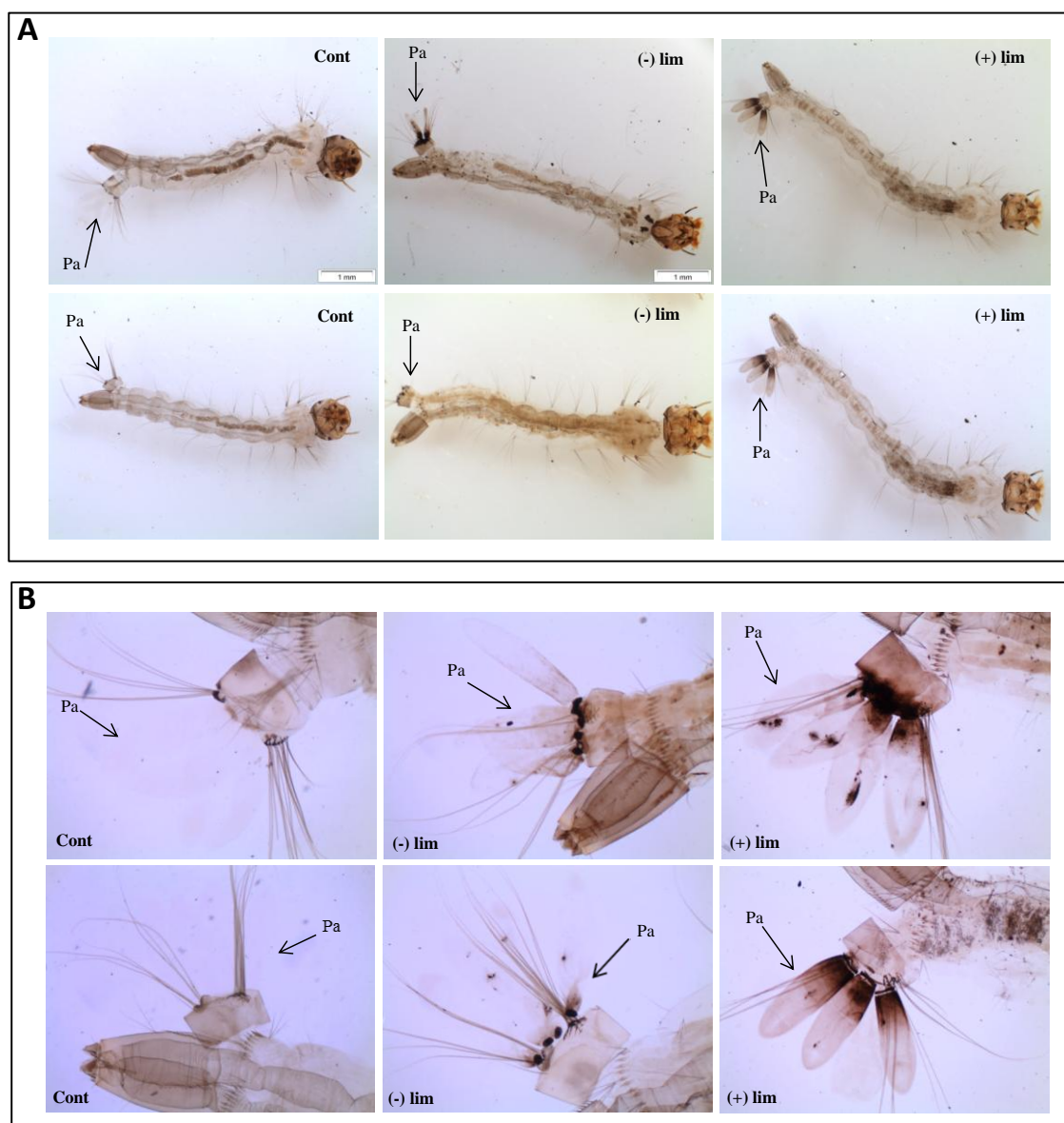


Figura 26 - Aspectos morfológicos das larvas de *Ae. aegypti* observadas ao estereomicroscópio (A); 1mm e ao microscópio óptico (B), 200 μm; cont=controle; lim = limoneno.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

V. Conclusões

A prevenção e combate das arboviroses e parasitoses transmitidas por vetores englobam um conjunto de medidas, tais como o controlo larvicida, o controlo adulticida e as medidas de proteção individual.

A nível mundial, a necessidade de diminuir a transmissão da malária e de providenciar um tratamento anti malárico eficaz é, mais uma vez, premente e as intervenções destinadas a controlar a doença, de uma maneira geral, podem classificar-se nas seguintes categorias:

- Evitar o contacto entre o vetor e os hospedeiros.
- Controlar a reprodução dos mosquitos através de modificações no meio ambiente.
- Utilizar inseticidas, de modo a reduzir a densidade vetorial.
- Tratamento dos doentes através da terapêutica adequada à situação local.

Na prática, e no que às formas adultas dos vetores diz respeito, estas categorias referem-se à utilização de redes mosquiteiras tratadas com inseticida e de produtos repelentes contra mosquitos, normalmente designadas de medida de proteção individual. A luta contra a malária e as arboviroses implica um esforço contínuo e integrado da investigação, quer ao nível da prevenção, quer ao nível do tratamento das doenças. O recurso a inseticidas sintéticos para o controlo das populações de mosquitos vetores de agentes patogénicos tem encontrado algumas barreiras, não só devido a fatores relacionados com a resistência dos vetores aos inseticidas químicos como também às repercussões ambientais, consequência da utilização dos mesmos. Por outro lado, e na grande maioria dos casos, a não existência de vacinas eficazes e a resistência múltipla dos agentes patogénicos aos fármacos, reforçam a importância da utilização simultânea de várias abordagens no controlo dos mosquitos vetores, tendo como objetivo a diminuição da transmissão da(s) doença(s) a eles associadas.

Considerando que são necessários mais avanços na investigação sobre medidas de controlo vetorial, foi selecionado um conjunto de plantas de duas regiões geográficas distintas, e assim proposto o desenvolvimento de um larvicida e de um adulticida à base

de plantas que, face aos convencionais, seja de fácil produção, de inocuidade ambiental e que não promova o desenvolvimento de resistência.

Selecionou-se um conjunto de plantas originárias de Cabo Verde e Portugal, nomeadamente *Melia azedarach* e *Azadirachta indica*, *Mentha pulegium*, *Foeniculum vulgare* e, ainda, a espécie *Sambucus nigra* só da flora portuguesa, dada a sua inexistência em Cabo Verde, para avaliação das suas propriedades inseticidas.

É relevante o facto de as plantas selecionadas poderem ser cultivadas e processadas localmente para a obtenção dos óleos respetivos com recurso a uma tecnologia de baixo custo. Este estudo visou a obtenção de um potencial inseticida a nível laboratorial que, transferido para um protótipo industrial permite o uso de metodologias adaptáveis a condicionantes locais de desenvolvimento, o que torna a continuação do estudo nesta área uma proposta aliciante e um incentivo em regiões economicamente deprimidas.

Devido ao elevado volume de trabalho e a dificuldades de obtenção e processamento do material vegetal, a caracterização química de todas as plantas não foi executado na íntegra:

- Os extratos de etanol e de hexano de *M. azedarach* e *A. indica* foram caracterizados por Cromatografia em Camada fina (CCF) e Cromatografia em Coluna (CC), tendo sido optimizados os eluentes mais adequados, mas não se prosseguiu com o fracionamento cromatográfico, devido ao facto dos resultados preliminares de rastreio larvicida não terem sido reprodutíveis de modo a definir os parâmetros letais (CL₅₀, CL₉₀ e CL₉₉).
- Os extratos de *S. nigra* EtOAc e EtOH foram caracterizados apenas por TLC e CC, tendo sido optimizadas todas as condições básicas para complementar o estudo do extrato mais ativo (*S. nigra* em acetato de etilo) por HPLC em trabalhos futuros.

Os óleos essenciais de *M. pulegium* e de *F. vulgare* de Cabo Verde e Portugal foram caracterizados qualitativamente e quantitativamente por CG-EM e confirmada a identificação dos seus constituintes por RMN, tendo sido obtido os seguintes resultados:

- OE de *M. pulegium* proveniente de Cabo Verde é diferente do OE *M. pulegium* de Portugal, sendo o de Cabo Verde constituído maioritariamente por mentol

(30,4%), mentona (15,3%) e acetato mentilo (14,7) e pelos compostos minoritários pulegona (4%), mentofurano (3,8%), linalool (3,3%), *neo*-mentol (2,5%) e β -cariofileno (2,5%), enquanto que o de origem portuguesa é maioritariamente constituído por pulegona (61,4%), mentona (20,1%), *iso*-mentona (2,2%) e mentol (1,5%).

- A análise por RMN do OE de *M. pulegium* de Portugal mostrou que a pulegona **1** é o seu principal composto, seguido de mentona **2**, enquanto no OE de Cabo Verde foi detetada uma pequena percentagem de pulegona **1**, sendo este óleo uma mistura complexa de mentona, mentol entre outros compostos terpénicos.
- Os compostos maioritários do OE de *F. vulgare* de Cabo Verde são *trans*-anetol (31,8%), limoneno (28,4%), fenchona (9,7%), β -pineno (7,3%), α -pineno (4,9%) e os minoritários *p*-cimeno (1,9%), β -mirceno (1,8%), acetato de β -fenchilo (1,7%) e estragol (1,3%) enquanto o OE comercial do *F. vulgare* de Portugal revelou ser uma mistura complexa de *p*-cimeno (6,9%), β -pineno (5,2%), estragol (3,1%), entre outros, sendo também os compostos maioritários o *trans*-anetol (29,8%) e o limoneno (17,5%), α -pineno (11,9%) e fenchona (9,6%).
- A análise do espectro de RMN de ^{13}C do OE de funcho de Cabo Verde detetou-se que o *trans*-anetol **4** e limoneno **5** são os constituintes maioritários. Enquanto o OE de funcho comercial de Portugal aparenta ser uma mistura complexa de fenchona, α -pineno, *p*-cimeno, α -felandreno, estragol e *cis*-anetol, entre outros.

Quanto a atividade larvícida em *Ae. aegypti* observou-se que:

- O extrato de *S. nigra* EtOAc apresentou elevada atividade larvícida, sendo a CL_{99} de 468,0 mgL^{-1} .

- As larvas do 3º estágio de *Ae. aegypti* são mais susceptíveis ao OE de *F. vulgare* (amostras de Cabo Verde e Portugal, respetivamente $CL_{50} = 23,3$ e $28,2 \mu L^{-1}$) comparativamente ao de *M. pulegium* (amostras de Cabo Verde e Portugal, respetivamente $CL_{50} = 136,1$ e $107,3 \mu L^{-1}$), na medida em que são necessárias menores doses para eliminar o mesmo número de mosquitos.
- Embora os testes estatísticos (Mann-Whitney, H de Kruskal-Wallis, não confirmem a existência de diferenças significativas entre as espécies de plantas estudadas, independentemente da origem geográfica, é de salientar que as concentrações necessárias para eliminar 50, 90 e 99% da população são menores no caso do OE de *F. vulgare*; a atividade larvicida deste óleo é elevada e comparável à do limoneno em larvas de *Ae. aegypti*, como confirmado pelo teste de Correlação de Pearson (bi-caudal).

Relativamente à atividade dos compostos ativos dos diferentes óleos essenciais:

- No caso de *M. pulegium* constatou-se que a elevada atividade larvicida da pulegona, um dos seus compostos maioritários, é consentânea com a atividade do respetivo OE bruto, ou seja com um CL_{50} de $58,5 \mu L^{-1}$ versus um CL_{50} de $107,3 \mu L^{-1}$.
- No caso de *F. vulgare*: para os compostos (-)-limoleno, (+)-limoleno, *trans*-anetol e estragol observou-se maior atividade dos dois primeiros compostos relativamente aos restantes, na medida em que são necessárias menores concentrações para se obter 50, 90 e 99% de mortalidade das larvas de *Ae. aegypti*.
- Estes resultados evidenciam a existência de efeitos sinérgicos entre vários dos constituintes ativos.

Quanto a atividade larvicida em *An. arabiensis*:

- Dadas as dificuldades na manutenção desta colónia foi difícil ter uma produção suficiente de larvas no mesmo estágio que permitisse realizar os ensaios

previstos, pelo que se optou por avaliar a planta que revelou maior atividade larvicida em *Ae. aegypti*, nomeadamente, *F. vulgare*.

- Efetuou-se apenas um ensaio tendo o resultado sido muito semelhante no que diz respeito as mortalidades causadas pelos OEs de *F. vulgare* de Cabo Verde e de Portugal. Em termos estatísticos também as diferenças não foram significativas.
- Ao comparar o resultado desde ensaio com os efetuados em *Ae. aegypti*, não se observaram diferenças significativas com o teste de Correlação de Pearson bicaudal, embora em termos de concentrações letais mínimas necessárias para obter 50, 90 e 99% de mortalidade pode-se observar que o *F. vulgare* de Cabo Verde pareça ser mais ativo para *Aedes aegypti*.

Relativamente aos ensaios adulticidas, os resultados obtidos são considerados preliminares, pois foram efetuados com uma amostra de reduzida dimensão, devido ao facto da câmara de manipulação de alta segurança para manipulação de *Ae. aegypti* ter uma área de manipulação restrita, o que não permitiu fazer as réplicas em simultâneo, tornando moroso o ensaio. Contudo estes ensaios permitiram otimizar as concentrações letais e também permitiu aferir a técnica de impregnação do papel de filtro.

- Os resultados preliminares demonstraram maior susceptibilidade quer de *Ae. aegypti*, quer do *An. arabiensis* ao OE de *F. vulgare* de Cabo Verde.

As pequenas diferenças constatadas nas doses letais mínimas entre as plantas da mesma espécie de Cabo Verde e Portugal, poderão estar relacionadas não só com as características genéticas, mas também com as características edafoclimáticas.

Neste estudo foi efetuada uma avaliação preliminar do modo de ação dos bio compostos, tendo sido constatadas alterações morfológicas na região da papila anal das larvas expostas aos compostos bio ativos. Observou-se ao microscópio óptico o escurecimento na base de inserção das papilas e ao longo das papilas, pelo que será importante em futuros estudos efetuar análise ultra-estrutural das regiões modificadas.

É imprescindível que no futuro, este estudo, iniciado no âmbito do projeto de doutoramento, seja aprofundado, na medida em que constitui uma mais-valia para a solução de um problema de saúde pública, aplicável tanto em comunidades de economia débil, como em centros economicamente desenvolvidos. Nomeadamente, os resultados de ensaios larvicidas com *F. vulgare*, tanto de origem portuguesa como cabo-verdiana foram bastante promissores, devendo os OE/compostos ativos desta planta ser alvo prioritário de aprofundamento. Esta aposta visa o desenvolvimento de medidas anti vetórias mais seguras para o ambiente e pretende ser um contributo para o desenvolvimento de estratégias para uma saúde pública sustentável em áreas endémicas e em regiões do globo onde tem ocorrido emergência e re-emergência de patologias com transmissão vetorial por espécies de mosquitos.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VI. Referências Bibliográficas

- ABBOTT W.S. A method of Computing the Effectiveness of Insecticide. *Journal of Economic Entomology* (1925) 18: 265-267.
- ADAMS, R. P. & T. A. ZANONI. Essential oils of plants of Hispaniola: I. The volatile wood oil of *Cinnamodendron ekmanii* (Canellaceae). *Moscossa* (1989) 5: 154-158.
- AHMED, S. & IDRIS, S. *Azadirachta indica* A.H.L. Juss. In: Hanum, I.F. e van der Maesen, L.J.G. (Eds). *Plant Resources of South-East Asia No. 11: Auxiliary plants*. Leiden, The Netherlands, Backhuys Publisher (1997a) p. 71-76.
- AHMED, S. e IDRIS, S. *Melia azedarach* L. In: Hanum, I.F. e Maesen, L.J.G. van der (Eds). *Plant Resources of South-East Asia No. 11: Auxiliary plants*. Leiden, The Netherlands, Backhuys Publisher (1997b) p. 187-190.
- ALVES, J. *Analyse de situação do paludismo em Cabo Verde*. Rapport du PNLP (1994).
- ALVES, J.; GOMES, B.; RODRIGUES, R.; SILVA, J.; AREZ, A.P.; PINTO, J., & SOUSA C.A.. Mosquito fauna on the Cape Verde Islands (West Africa): an update on species distribution and a new finding. *Journal of Vector Ecology* (2010) 35(2) 307-12.
- AMER, A. & MEHLHORN H. "Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* larvae (Diptera, Culicidae)". *Parasitol Res* (2006a) 99: 466-472p.
- AMER, A. & MEHLHORN H. Persistency of larvicidal effects of plant oil extracts under different storage conditions. *Parasitol Res.* (2006b) 99:473-477.
- ARAQUE, M.; ROJAS, L.B. & USUBILLAGA, A. Antibacterial activity of essential oil of *F. vulgare* Miller against multiresistant Gram-negative bacilli from nosocomial infections. *Science* (2007) 15(3): 366-370.
- AREMU, O.I.; FEMI-PYEW, M. N. & ONABANJO, O. Repellent Action of Neem (*Azadirachta indica*) Seed Oil Cream against *Anopheles gambiae* Mosquitoes, *African Research Review* (2009) 3(3):12-22.
- AZEVEDO, J.L. Microorganismos endofíticos. Cit. por *Ecologia Microbiana*. Melo, I.S., Azevedo, J.L. (eds). Editora EMBRAPA, Jaguariúna, São Paulo, Brasil (1998) 117-137.
- BANERJEE, R.; MISRA, G. & NIGAM, S.K. Role of indigenous plant material in pest control. *Pesticides* (1985) 19 (3): 32-38.
- BANERJEE, S.; KIM, L. M.; SHARIF, M.; KHATOON, H. & YUSOFF, F.M. Antibacterial Activity of Neem (*Azadirachta indica*) Leaves on *Vibrio* spp. Isolated

from Cultured Shrimp *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* (2013) 8(2): 355-361.

BARKAT, M. & BOUGUERRA, A. Study of the antifungal activity of essential oil extracted from seeds of *Foeniculum vulgare* Mill. for its use as food conservative. *African Journal of Food Science* (2012) 6(9): 239-244.

BARROSO J. & PEDRO L. Análise de produtos naturais: cromatografia gás-líquido e espectrometria de massa na análise de óleos essenciais. *Ciência*, Faculdade de Ciências de Lisboa (1991) 20-24.

BASTO. *Azadirachta indica* A. Juss. In: *Mém. Mus. Nat. Hist. Nat.*, 19: 221 (1830). Basto cit por Garcia de Orta, *Sér. Bot.* (1987) 9:3.

BEGHIDJA, N.; BOUSIMANI, N.; BENAYACHE, F.; BENAYACHE, S. & CHALCHAT, J. C. Composition of the oils from *Mentha pulegium* grown in different areas of the East of Algeria. *Chem. Natural Compounds*, (2007) **43** (4) 481-483.

BENAYAD, N.; EBRAHIM, W.; HAKIKI, A. & MOSADDAK, M. Chemical characterization and insecticidal evaluation of the essential oil of *Mentha suaveolens* L. and *Mentha pulegium*, *Scientific Study & Research* (2012) 13 (1): 27-32.

BENELLI, G.; FLAMINI, G.; GIULIA F. G.; CIONI, P.L. & CONTI, B. Larvicidal and repellent activity of the essential oil of *Coriandrum sativum* L. (Apiaceae) fruits against the filariasis vector *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* (2012) 3246-6.

BERGAMASCHI, J.M. Terpenos, Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento da Terpenoil, Tecnologia Orgânica in www.terpenoil.com.br.

BESANSKY N.J.; POWELL J.R.; CACCONE, A.; Hamm, D.M.; Scott, J.A. e Collins F.H. "Molecular phylogeny of the *Anopheles gambiae* complex suggests genetic introgression between principal malaria vectors". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, (1994) 91 (15): 6885-8.

BEZERRA-SILVA, G.C.D.; VENDRAMIM, J.D.; SILVA, M.A. & DIAS, C.T.S. Efeito de extractos orgânicos de Meliaceae sobre *Bemisia tabaci* (Gennadius) biótipo B em tomateiro. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, (2010) 77(3) 477-485.

BLISS, C. I. Bliss The calculation of the dosage-mortality curve, *Annals of Applied Biology*, (1935) 22, 134-167.

BORGES, S.M.A.A. Importância epidemiológica do *Aedes albopictus* nas Américas (2001). *Dissertação de Mestrado*. Acedido em Junho de 2010. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/86/Martados_anjos2.pdf

BRAGA, I. & VALLE, D. *Aedes aegypti*: insecticides, mechanisms of action and resistance. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, (2007) 16(4), pp.295-302., (conceito de resistência)

BROGDON, W.G. & McALLISTER, J.C. Synopses “Insecticide resistance and vector control”, *Emerg. Inf. Diseases* (1998) 4: 605-611.

BROWN, M.D.; KAY, B.H. & HENDRIKZ, J.K. Evaluation of australian mesocyclops (Cyclopoida: Cyclopidae) for mosquito control. *Journal of Medical Entomology* (1991) 28: 5618-623.

CABRAL, M.M.O.; AZAMBUJA, P.; GOTTLIEB, O.R. & GARCIA, E.S. Effects of some lignans and neolignans on the development and excretion of *Rhodnius prolixus*. Tallahassee: *Fitoterapia*. (2000) 71: 1-9.

CAMBOURNAC, F.J., PETRARCA V. & COLUZZI M. *Anopheles arabiensis* in the Cape Verde archipelago. *Parassitologia*, (1982) 24: 265-267.

CARPINELLA, C.; FERRAYOLI, C.; VALLADARES, G.; DEFAGÓ, M.; PALACIOS, S. Potent limonoid insect antifeedant from *Melia azedarach*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (2002) 66 (8):1731-1736.

CARPINELLA, M.C.; HERRERO, G.G.; ALONSO, R.A.; PALACIOS, S.M. Antifungal activity of *Melia azedarach* fruit extract. *Fitoterapia* (1999) 70: 296-298.

CARPINELLA, M.C.; MIRANDA, M.; ALMIRÓN, W.R.; FERRAYOLI, C.G.; ALMEIDA, F.L. & PALACIOS, S.M. *In vitro* pediculicidal and ovicidal activity of an extract and oil from fruits of *Melia azedarach* L. *Journal of the American Academy of Dermatology* (2007) 56(2): 250-256.

CARVALHO, A.M. *Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal*. Biblioteca de Ciencias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid (2010) 450.

CASER, C. R. S.; GLAUCO A. C.; GASPERAZZO, W; CRUZ, Z. M. A. & SILVA, A.G., Atividade biológica das folhas secas de Neem, *Azadirachta indica*, sobre larvas de *Aedes aegypti*. *Natureza* (2007) 5(1): 19-24. [on line] <http://www.naturezaonline.com.br>

CHANTRAINE JM, LAURENT D, BALLIVIAN C, SAAVEDRA G, IBAÑEZ R & VILASECA LA. Insecticidal activity of essential oils on *Aedes aegypti* larvae. *Phytoterap Res* (1998) 12:350-354.

CHANTRAINE, J.M.; LAURENT, D., BALLIVIAN, C., SAAVEDRA, G. ; IBANEZ, R. e VILASECA, L.A. Insecticidal activity of essential oils on *Aedes aegypti* larvae. *Phytother. Res.*, (1998) 12(5) 350-354.

CHARLWOOD, B.V. e BANTORPE, D.V. Terpenoids, Cit por Harborn, J.B. & Dey, P.M. (Edts.), *Methods in Plant biochemistry* (1991) vol. 7 by Academic Press, London.

CHENG, S.; LIU, J.; TSAI, K.; CHEN, W. & CHANG, S. Chemical composition and mosquito larvicidal activity of essential oils from leaves of different *Cinnamomum osmophloeum* provenances. *J. Agric. Food Chem* (2004) 52: 4395-4400.

CHEVALIER, A. *Melia azedarach* L., Sp. Pl.: 384 (1753) - In *Rev. Bot. Appl. Agric. Trop.* (1935)15: 948. A. Hansen & Sunding Cit. por Sommerfeltia (1993) 17:152. Est. I.

CHOI, W.; LEE, E.; CHOI, B., PARK, H. e AHN, Y. Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Econ. Entomol* (2003) 96 (5): 1479-1484.

CHUNG I.M.; RO H.M. & MOON H.I. Major essential oils composition and immunotoxicity activity from leaves of *Foeniculum vulgare* against *Aedes aegypti* L. *Immunopharmacol Immunotoxicol* (2011) 33(3): 450-3.

CLEVENGER, J. F.. Apparatus for the determination of volatile oil. *Assoc. of Agricult. Chem. J.* (1928) 17: 346p.

COETZEE M.; CRAIG M. & LE SUEUR D. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the *Anopheles gambiae* complex. *Parasitol Today* (2000) 16: 74-77.

COLLINS, H.F.; KAMAU, L.; RANSON, H.A. & VULULE, J.M. Molecular Entomology and prospects for malaria control. *Bulletin of the World Health Organization* (2000) 78: 1412-1423.

COLUZZI, M. Malaria and Afrotropical ecosystems. Impact of man-made environmental changes, *Parassitologia* (1994) 36 (1-2): 223-227.

CONCEIÇÃO, C. Potencialidades de produtos naturais de origem vegetal como meio de protecção contra *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) em milho armazenado. Tese de doutoramento em Engenharia Agronómica, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa (2008) 253.

CONCEIÇÃO, C.; MATOS, O.; BARBOSA, A. & MEXIA, A. Potential of plant products as protectants of stored maize against *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). Cit. por Carvalho, O.M.; Fields, P.G.; Adler, C.S.; Arthur, F.H.; Athanassiou, C.G.; Campbell, J.F.; Fleurat-Lessard, F.; Flinn, P.W.; Hodges, R.J.;

Isikber, A.A.; Navarro, S.; Noyes, R.T.; Riudavets, J.; Sinha, K.K.; Thorpe, G.R.; Timlick, B.H.; Trematerra, P. e White, N.D.G. (Eds), *Proceedings of the 10th International Working Conference of Stored Product Protection*. Julius Kühn-Institut, Berlin, Germany (2010) 618-624.

CONTI, B.; CANALE, A.; BERTORLI, A.; GOZZINI, F. & PISELLI, L. Essential oil composition and larvicidal activity of six Mediterranean aromatic plants against the mosquito *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res.* (2010) 107(6): 1455-61.

CORIA, C.; ALMIRON, W.; VALLADARES, G.; CARPINELLA, C.; LUDUEÑA, F.; DEFAGO, M. & PALACIOS, S. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Bioresource Technology* (2007) (99): 3066-70.

COSTA, C.M.T. Atividade anti-helmíntica de *Azadirachta indica* A. Juss sobre nematóides gastrintestinais de ovinos. Tese de Mestrado Fortaleza - Ceará (2004).

CUAMBA, N. & MENDIS, C. The role of *Anopheles merus* in malaria transmission in an area of southern Mozambique. *Journal of Vector Born Disease* (2009) 46: 157-59.

DANTAS, D.A.; MAGANHA, M.; BERITTA, T.E.; NOZU, P.; PEREIRA, G.S.; MATIAS, R.; SOLON, S.; RESENDE, U.; KOLLER, W.W. & GOMES, A. Estudo fitoquímico dos frutos de *Melia azedarach* L. (Cinamomo, Meliaceae). In: Encontro de pesquisa e iniciação científica da UNIDERP 2, MS. *Resumos*, Campo Grande. (2000) 119-120.

DAVIDSON, G. "The *Anopheles gambiae* complex", In *Genetics of Insect Vectors of Disease*, Ed. Wright, J. W. & Pal, R., *Elsevier Publ.*(1967), Londres.

DELLATORRE, A.; CONSTANTINI, C.; BESANSKY, N.J.; CACCONE, A.; PETRARCA, V.; POWELL, J.R. & COLLUZI, M. Speciation within *Anopheles gambiae* - the glass is half full. *Science* (2002) 298: 115-117.

DIAZ-MAROTO, M.S.; PEREZ-COELLO, S.; ESTEBAN, J. & SANZ, J. Comparison of the volatile composition of wild fennel samples (*Foeniculum vulgare* Mill.) from Central Spain. *J. Agric. Food Chem.* (2006) 54: 6814-18.

DONALÍSIO, M.R. & GLASSER, C.M. Vigilância entomológica e controle de vetores do dengue. *Revista Brasileira de Epidemiologia* (2002) 5: 3259-79.

DUA, V.K.; PANDEY, A.C.; RAGHAVENDRA, K.; GUPTA, A.; SHARMA, T. & DASH, A.P. Larvicidal activity of nem oil (*Azadirachta indica*) formulation against mosquitoes. *Malaria J.* (2009) 8: 124. doi: 10.1186/1475-2875-8-124.

DUKE, J.A. *The Handbook of Biologically Active Phytochemicals and their activities*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida (1992).

- EL-ADLY, A.; ABADA, E.A. & GHARIB, F. A. Antibacterial effects of low power laser light and volatile oil of fennel (*F. vulgare* var. *dulce*) on Gram positive and Gram negative bacteria. *Int. J. Agric. Biol.* (2007) 9(1): 22-6.
- EL-GHORAB, A.H. The chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil from Egypt and its antioxidant activity. *J. Essential oil Bearing Plant*, 9: 183-195. Cit. por MAHBOUBI, M. & HAGHI, G., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J. Ethnopharm.* (2006) 119: 325-7.
- ENAN E. Insecticidal activity of essential oils: Octopaminergic sites of action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* (2001) 130(3):325-37.
- EVANS, D. Multiple receptos types for octopamine in the locust. *Journal of Physiology* (1981) 318: 99-122.
- FAIZA M. H.; FAWZIA H.; ABDEL-RAHMAN & MAHMOUD A. S. *Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils from Organically Cultivated Fennel Cultivars Molecules* (2011) 16: 1366-77. doi:10.3390/molecules16021366.
- FARENHORST, M.; MOUATCHO, J.C.; KIKANKIE, C.K.; BROOKE, B.D.; HUNT, R.H.; THOMAS, M.B.; KOEKEMOER, L.L.; KNOLS, B.G.J. & COETZEE, M. Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *PNAS*, (2009) 106(41): 17443-7.
- FATHY, H.M. Studies on some biocide-producing microorganisms. M. Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Cairo University (2002) 274.
- FAUST, E.C.; BEAVER, P.C. & JUNG, R.C. Agentes e vetores animais de doenças humanas. 4ª Edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian (1975) 626.
- FIGUEIREDO A. C.; BARROSO, J. G. & PEDRO, L. G. (Eds). Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático, Edição Centro de Biotecnologia Vegetal - Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal (2007) (3ª Edição ISBN: 978-972-9348-16-7).
- FINNEY, D.J. *Probit Analysis* (1971)third ed. University Press, Cambridge.
- FONTENILLE, D.; LOCHOUARN, L.; DIATTA, M.; SOKHNA, C.; DIA, I., DIAGNE, N.; LEMASSON, J.J.; BA, K.; TALL, A.; ROGIER, C.; TRAPE, J.F. Four years' entomological study of the transmission of seasonal malaria in Senegal and the bionomics of *Anopheles gambiae* and *A. arabiensis*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* (1997) 91: 647-652.

- FORATTINI, O.P. Culicideologia Médica. São Paulo, EDUSP (2002). [https://www.google.pt/?gws_rd=cr&ei=WkZFUuTbD43BswaLpYGYBw#q=Forattini,+O.P.+Culicidologia+M%C3%A9dica.+S%C3%A3o+Paulo,+EDUSP+\(2002\)&spell=1](https://www.google.pt/?gws_rd=cr&ei=WkZFUuTbD43BswaLpYGYBw#q=Forattini,+O.P.+Culicidologia+M%C3%A9dica.+S%C3%A3o+Paulo,+EDUSP+(2002)&spell=1)
- FRADIN, M.S. & DAY, J.F. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *The New England Journal of Medicine* (2002) 347: (1) 138.
- FRANCO, J. do AMARAL. Instruções para a redacção dos textos destinados à Flora Lusitanica, Azorica et Madeirensis. *Anuário da Sociedade Broteriana* (1972) 38: 53-60.
- FRANCO, J. do AMARAL. *Nova flora de Portugal (continente e Açores)*, vol. 1. Sociedade Astória, Lisboa (1971).
- FU, G., LEES, R.S., NIMMO, D., AW, D., JIN, L., GRAY, P., BERENDONK, T., COOPER, H.W., SCAIFE, S., PHUC, H.K., MARINOTTI, O., JASINSKIENE, N., JAMES, A.A. & ALPHEY, L. Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2010) 107(10), 4550-4554.
- FUENTE, E.B.; GIL, A.; LENARDIS, A.E.; PEREIRA, M.L.; SUAREZ, S.A.; GHERSA, C.M.; GRASS, M.Y. Response of winter crops differing in grain yield and essential oil production to some agronomic practices and environmental gradient in the Rolling Pampa. Argentina. *Agr. Ecosyst. Environ.* (2003) 99: 59-169.
- GARDAIS, J. F., GARIN PH., PREVÔT, A., SERPINET, J., TRAUCHANT, J. & UNTZ G. (1982). *Manuel pratique de Chromatographie en phase gazeuse*. Ed. Masson.
- GATA-GONÇALVES, L.; NOGUEIRA, J.M.F.; MATOS, O. & SOUSA, R.B. "Photoactive extract from *Thevetia peruviana* with antifungal properties against *Cladosporium cucumerinum*". *J. Photoch. and photob. B: Biology* (2003) 70: 51-4.
- GEORGHIOU, G. P. Principles of insecticide resistance monagement. *Herbicide Resistance Work Shop*. Edmonton 1993. (*Phytoproduction* 1994) 75 (Suppl.): 51-59.
- GHO (Global Health Observatory), 2008. Acedido em Outubro de 2010. http://www.who.int/gho/mdg/diseases/malaria/situation_mortality.
- GIATROPOULOS, A.; PAPACHRISTOS, D.P.; KIMBARIS, A.; KOLIOPOULOS, G.; POLISSIOU, M.G.; EMMANOUEL, N. & MICHAELAKIS A. Evaluation of bioefficacy of three Citrus essential oils against the dengue vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in correlation to their components enantiomeric distribution. *Parasitol Res.* Global Health Observatory (2012) doi:10.1007/s00436-012-3074-8.
- GILLIES, M.T. & de MEILLON, B. The *Anophelinae* of Africa south of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). Johannesburg: South African Institute for Medical Research. Johannesburg. Publications of the South African Institute for Medical Research (1968) no. 54, 343.

- GNOATTO, S.C.B.; BASSANI, V.L.; COELHO, G.C. & SCHENKEI, E.P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis*, A. St.- Hil., Aquifoliaceae). *Química Nova* (2007) 30 (2): 304-7.
- GONÇALVES, A. E. Flora de Cabo Verde, Plantas vasculares, 61- Meliaceae. *IBUC, INIDA, Coimbra e Cabo Verde* (2002).
- GRATZ, N.G. & PAL. Malaria vector control: larviciding. Cit. por *Malaria: Principles and Practices of Malariology*. Edited by Wernsdorfer WH, McGregor I. London: Churchill Livingstone (1989) 1213-1226.
- GRAYER, R. J. & KOKUBUN, T. Plant fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* (2001) 56(3): 253-263.
- GRUENWALD, J.; BRENDLER, T. & JAENICKE, C. PDR for Herbal Medicines, *Medical Economic Company*, Montvale, NJ, 975-975. Cit. por Aghel, N., Yamini, Y., Hadjiakhoondi, A. and Pourmortazavi, S. M., 2004. Supercritical carbon dioxide extraction of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Talanta* (1998) 62: 407-11.
- GRUNDY, D.L. e Srill, C.C. Inhibition of acetylcholinesterases by pulegone-1,2 epoxide. *Biochemistry and Physiology* (1985) 23: 383-388.
- GUBLER, D.G. Ressurgent Vector Born Diseases as Global Health Problem. *Emerg. Infect. Dis.* (1998) 4: 442-50.
- GUBLER, D.J. & CLARK, G.G. Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: the Emergence of a Global Health Problem. *Emerg. Infect. Dis.* (1995) 2(1): 55-7.
- GUBLER, D.J. & KUNO, G. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. Cab International. USA (1997) 478.
- GUERRINI, A.; SACCHETTI, G.; MUZZOLI, M.; RUEDA, G.M.; MEDICI, A.; BESCO, E. & BRUNI, R. Composition of the Volatile Fraction of *Ocotea bofo* Kunth (Lauraceae) Calyces by GC-MS and NMR Fingerprinting and Its Antimicrobial and Antioxidant Activity *J. Agric. Food and Chem* (2006), 54, 7778-88.
- GUILHERME, M.; DONALÍSIO, R. & ROMARIZ D. F. Inseticidas naturais. *Casa da Agricultura*, Ano 8 (Março/Abril) (1986) 12-16.
- GURPREET, K.; SARWAR, A. M. & ATHAR, M. Nimbidin suppresses functions of macrophages and neutrophils: relevance to its antiinflammatory mechanisms. *Phytother Res.* (2004) 18: 419-24.
- HAIR, J.F., RONALD, T. L., ROLPH, A.E. & WILLIAM, B. *Multivariate Data Analysis*, 5th Edition (1998). Prentice-Hall, Inc.

HALSTEAD, S.B. Dengue, tropical medicine: science and practice, Volume 5, *Imperial College Press* (2008) 75-84.

HANCOCK, P.A., SINKINS, S.P. & GODFRAY, H.C. Strategies for introducing *Wolbachia* to reduce transmission of mosquito-borne disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* (2011) 5(4): e1024.

HARRIA-WARRICK, R.; LIVINGSTONE, M. & KRAVITZ, E.A. Central effects of octopamina and serotonin postural motor systems in the lobster. *Neuroscience Abstract* (1980) 6:27-31.

HEDENQVIST, P. & HELLEBREKERS, L.J. Laboratory animal analgesia, anesthesia, and euthanasia. Cit. por Hau, J and Van Hoosier, GL (Eds.) *Handbook of laboratory animal science*. (2nd. Edn.), CRC Press, Boca Raton (2003) : 413-455.

HENDERSON, L., Invasive alien woody plants of the northern Cape. *Bothalia* (1991) (21) 177-189.

HOLMES, E.C.; BARTLEY, L.M. & GARNET, G.P. The Emergence of Dengue Past, Present and Future. Cit. por *Emerging Infector* Ed. Krause, R.M. Academic Press, London (1998).

HOWARD, A.F.V.; ADONGO, E.A.; HASSANALI, A., OMLIN, F.X., WANJOYA, A., ZHOU, G. & VULULE, J. Laboratory evaluation of the aqueous extract of *Azadirachta indica* (neem) wood chippings on *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *J Med Entomol* (2009) 46(1):107-114.

HOWARD, A.F.V; KOENRAADT, C.J.M.; FARENHORST, M.; KNOLS, B.G.J. & TAKKEN, W. Pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* leads to increased susceptibility to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* *Malaria Journal* (2010) 9:168 .

HUANG, R.C.; OKAMURA, H.; IWAGAWA, T.; TADERA, K. & NAKATANI, M. Azedarachin C, a limonoid antifeedant from *Melia azedarach*. *Phytochemistry* (1995) 38:593-4.

HUNT R.H., COETZEE M., FETTENE M. The *Anopheles gambiae* Complex: a New Species from Ethiopia. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.* (1998) 92: 231-5.

IKRAM, I.; IMRAN, K.; MOHAMMAD, T. & IZHAR, A. Larvicidal Activities of Different Parts of *Melia azedarach* Linn. against *Culex quinquefasciatus* Say. (Diptera: Culicidae). *Journal of Basic & Applied Sciences* (2012) 8: 23-8.

ISAH, A.B.; IBRAHIM, Y.K. & IWALEWA, E.O. Evaluation of the antimalarial properties and standardization of tablets of *Azadirachta indica* (Meliaceae) in mice, *Phytother Res.* (2003) 17(7): 807-10.

- ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* (2000) 19: 603-608.
- JAIN, D.C. Antifeedant active saponin from *Balanites roxburghii* stem bark. *Phytochemistry* (1987) 26 (8): 2223-5.
- JAMES, A.A.,. Mosquito Molecular Genetic. The hand that feed bite back. *Science* (1992) 257: 37-38.
- JANSEN, C. C. & BEEBE, N. W. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes and Infection* (2010) 12(4): 272-279.
- JAZANI, N.H.; GHASEMNEJAD-BERENJI, H. & SADEGPOOR, S. Antibacterial effects of Iranian *Mentha pulegium* essential oil on isolates of *klebsiella* sp. Pakistan. *J. Biological Sci.* (2009) 12 (2): 183-5.
- JENNINGS, W. *Analytical Gas Chromatography* (1987). Ed Academic Press.
- JOHNSON, A.W. New path to novel environmentally acceptable natural products. Chemical pest management. *Current Themes of Tropical Science* (1983) 2: 59-72.
- KARUNAMOORTHY, K. & SABESAN, S. Field trials on the efficacy of DEET-impregnated anklets, wristbands, shoulder, and pocket strips against mosquito vectors of disease. *Parasitology research* (2009) 105(3): 641-5.
- KAY, B.; NAM, V.S.; TIEN, T.V.; YEN, N.T.; PHONG, T.V.; DIEP, V.T., NINH, T.U., BEKTAS, A. & ASKOV, J.G. Control of *Aedes* vectors of dengue in three provinces of Vietnam by use of Mesocyclops (Copepoda) and community-based methods validated by entomologic, clinical, and serological surveillance. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* (2002) 66 (1): 40-8.
- KELSEY, R.G.; REYNOLDS, G.W. & RODRIGUEZ, E. *Biology and Chemistry of Plant Trichomes*. Eds Rodriguez, E., Healey, P.L., Metha, I. Plenum Press. New York (1984).
- KHAJISTA, J., SHAHNAZ H., SHGUFTA N. & SUMERA, I. Antifungal activity of *Azadirachta indica* against *Alternaria solani*. *Journal of Life Sciences and Technologies* (2013) 1(1):89-93.
- KHAN, A, V, KHAN, A. A. & SHUKLA, I. *In Vitro* Antibacterial Potential of *Melia azedarach* Crude Leaf Extracts Against Some Human Pathogenic Bacterial Strains. *Ethnobotanical Leaflets* (2008) 12: 439-45.
- KHAN, M.R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A.D. Antimicrobial activity of *Horsfieldia helwiigi* and *Melia azedarach*. *Fitoterapia* (2001) (72): 423-7.
- KIKANKIE, C.K.; BROOKE, B.D.; KNOLS, B.G.J.; KOEKEMOER, L.L., FARENHORST, M.; HUNT, R.H., THOMAS, M.B. & COETZEE, M. The infectivity

of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to insecticide-resistant and susceptible *Anopheles arabiensis* mosquitoes at two different temperatures. *Malaria Journal* (2010) 9: 71.

KIM, D. H. & AHN, Y. J. Contact and fumigant activities of constituents of *F. vulgare* fruit against three coleopteran stored-product insects. *Pest Manag. Sci.* (2001) 57: 301-6.

KIRAN SR, BHAVANIK, DEVI PS, RAO BRR & REDDY KJ. Composition and larvicidal activity of leaves and stem essential oils of *Chloroxylon swietenia* DC against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Bioresour Technol.*doi:10.1016/j.biortech.2005.10.003

KNAAK, N. & FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. *Neotropical Biology and Conservation* (2010) 5(2):120-132pp. [http://dx. doi: 10.4013/nbc.2010.52.08](http://dx.doi.org/10.4013/nbc.2010.52.08).

KNIPING, E.F. Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology* (1955) 48(4):459-462.

KNOLS, B.G.J. Natural products for malaria vector control: flora, fish and fungi. (2010) 17:16. <http://www.malariaworld.org/blog/natural-products-malaria-vector-control-flora-fish-and-fungi>.

KOMALAMISRA N, TRONGTOKIT Y, RONGSRIYAM Y & APIWATHNASORN C. Screening for larvicidal activity in some Thai plants against four mosquito vector species. *Southeast Asian J TropMed Public Health* (2005) 36:1412-1422.

KOSTYUKOVSKY M., RAFAELI A., GILEADI C., DEMCHENKO N. AND SHAAYA E. Activation of octopaminergic receptors by essential oil constituents isolated from aromatic plants: possible mode of action against insect pests. *Pest. Manag. Sci.* (2002) 58:1101-1106.

KOUL, O. Insect feeding deterrents in plants. *Indian Review of Life Science* (1982) 2: 97-125.

KOWALCHIK, C. &HYLTON, W.H. eds. *Rodales Illustrated Encyclopedia of Herbs*, Rodale Press: Emmaus, Pennsylvania (1988) 188.

KUBECZKA, K.H.; FORMÁČEK, V. Essential Oils Analysis by Capillary Gas Chromatography and Carbon-¹³NMR Spectroscopy, 2nd ed., (2002) Wiley: New York.

KUMAR SATISH; GOYAL, K.K. & BILAL, S. Anthelmintic activity of *Cuminum cuminum*, *Foeniculum vulgare* and *Eugenia caryophyllus* against *Pheritima posthuma*. *Indonesian Journal of Pharmacy* (2012) 23 (4): 225.

- KUMAR, P., MISHRA, S., MALIK, A. & SATYA, S. Insecticidal properties of *Mentha* species. *Industrial Crops and Products* (2011) 34: 802-17.
- LACEY L.A.; FRUTOS R.; KAYA H.K. & VAIL P. Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biological Control* (2001) 21: 230-48.
- LEE, C. H.; SUNG, B.K. & LEE, H. S. Acaricidal activity of fennel seed oils and their main components against *Tyrophagus putrescentiae*, a stored-food mite. *J. Stored Prod. Res* (2006) 42: 8-14.
- LICHTENTHALER H.K. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via mevalonate independent pathway. *FEBS Letters* (1997) 400: 271-4pp.
- LILLO, A.L. MELIACEAE. Cit. por Cáceres, J.M.S.L. (Ed.) *Flora ornamental Española*, vol. 5. Madrid, Barcelona, México, Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Ediciones Mundi-Prensa (2007).
- LIVINGSTONE, M.; HARRIA-WARRICK, R. & KRAVITZ, E.A. Serotonin and octopamina produce opposite postures in lobsters. *Science* (1980) 208:76-79.
- LOBO, A.M: & LOURENÇO, A. M. Biossíntese de produtos naturais. IST Press, 2007, 272.
- LOGAN, J.G.; STANCZYK, N.M.; HASSANALI, A.; KEMEL, J.; SANTANA, A.E.; RIBEIRO, K.A., PICKETT, J.A. & MORDUE, LUNTZ, A.J. Arm-in-cage testing of natural human-derived mosquito repellents. *Malaria Journal* (2010) 9:239.
- LORD, J.C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology* (2005) 89(1):19-29.
- LYDON, J., DUKE, S.O. The Potential of Pesticides from Plants. **In** *Herbs, Spices and Medicinal Plants: Recent Advances in Botany, Horticulture and Pharmacology* (1989) Vol. 4, Eds Cracker, L.E. & J.E. Simon J.E.. Oryx Press, Phoenix.
- MABBERLEY, D.J. *Mabberleys's plant-book*. 3ª ed. Cambridge, Cambridge University Press (2008).
- MAGALHÃES LAM, LIMA MP, MARQUES MOM, FACANALI R, PINTO ACS & TADEI WP. Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae of essential oils from four Guarea species. (2010) *Molecules*. doi:10.3390/molecules15085734
- MAHBOUBI, M. & HAGHI G. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J Ethnopharmacol* Sep 26 (2008) 119 (2): 325-7.
- MALARIA FOUNDATION INTERNATIONAL. About Malaria. Acedido em janeiro de 2012. <http://www.malaria.org/index> (2008).

MANEZ, C.; LÓPEZ, M.; NIETO, C.; SOLAVAGIONE, L. & SEBRIÁN, J. “Saúde e beleza naturais, plantas para o bem-estar”. *Círculo de Leitores* (2008) 375.

MARCANO, D. & HASEGAWA, M. Fitoquímica orgânica. Universidad Central de Venezuela. *Consejo de desarrollo Científico y Humanístico*. Caracas (1991) 17-38.

MARCONDES, C. B. Doenças transmitidas e causadas por Artrópodes. Ed. Atheneu, Rio de Janeiro (2009) 557.

MARIAS, R., SOLON, S., RESENDE, U. M., GOMES, A. & KOLLER, W. W., 2002. *Melia azedarach*, uso popular x estudos químicos e farmacológicos: breve revisão. *Ensaio e Ciência*: ed. UNIDERP, Campo Grande, **6**(1): 91-121.

MAROTTI, M.; DELLACECCA, V.; PICCAGLIA, R.; GIOVANELLI, & SIMON, J.E. Agronomic and chemical evaluation of three “varieties” of *Foeniculum vulgare* Mill. *Acta Horticulture* (1993) 331: 63-69.

MAROTTI, M.; PICCAGLIA, R.; GIOVANELLI, E.; DEANS, S. & EAGLESHAM, E. Effects of Variety and Ontogenic Stage on the Essential Oil Composition and Biological Activity of Fennel. *J. Essent. Oil Res.*, (1994) 6, 57-62.

MARQUARDT, W.C. Biology of disease vectors (Second Edition). Academic Press, Amsterdam, (2010) 785.

Martinez, S.S. (Ed). O Nim - *Azadiractta indica*, natureza, usos múltiplos, produção. Publicado pelo IAPAR - Londrina (2002).

MASSEBO F, TADESSE M, BEKELE T, BALKEW M & GEBRE-MICHAEL T. Evaluation on larvicidal effects of essential oils of some local plants against *Anopheles arabiensis* Patton and *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) Cit. por Ethiopia. *Afr J Biotechnol* (2009) 8:4183–4188.

MATA, A.T., PROENÇA, C., FERREIRA, A. R., SERRALHEIRO, M.L.M., NOGUEIRA, J. M. F. & ARAÚJO, M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chem.* (2007) 103: 778-786.

MATOS, O. C. Uso de Substâncias Naturais de Origem Vegetal com Actividade Biológica na Protecção das Culturas Agrícolas. *Agronomia Lusitana* (2000) 48 (2): 1-44.

MATOS, O.C., ROCHA D. K. E GRÁCIO, A.S. Natural Products of plant origin useful to control insects - *Vectors of Diseases Abstract Book of XI Iberic Congress of Parasitology* (2009)16:1/2, 8-9 (Comunicação Oral).

MELLO M.O. & SILVA-FILHO M.). Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Braz. J. Plant Physiol.* (2002) 14(2):71-81.

- MBATH, A.U.; UDEINYA, I.J., SHU, E.N.; CHIJOKE, C. P.; NUBILA T. & UDEINYA, F. Fractionated neem leaf extract is safe and increases CD4+ cell levels in HIV/AIDS patients, *Am. J. Ther* (2007) 14(4): 369-74.
- MCCALL, P.J. E KITTAYAPONG, P. Control of dengue vectors: tools and strategies. In report of the scientific working group on dengue. *Meeting report. 1-5 October 2006, Geneva, Switzerland* (2007) 110-119.
- MCKENNA, M.M.; HAMMAD, E.M. & FARRAN, M.T. Effect of *Melia azedarach* (Sapindales: Meliaceae) fruit extracts on Citrus Leafminer *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Springerplus* (2013) 5: 2(1):144.
- MENDES, M.E.E. Uso de substâncias no combate a pragas. *Laboratório Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial - Departamento de Tecnologia das Indústrias Químicas* 4 (1989) Lisboa.
- METCALF, R.L. Plant volatiles as insect attractants. CRC, *Critical Reviews in Plant Science* (1987) 5 (5): 251-301.
- MICHELAKIS A.; PAPACHRISTOS, D.; KIMBARIS A. & POLISSIOU M. Larvicidal evaluation of three *Mentha* species essential oils and their isolated major components against the West Nile virus mosquito. *Hellenic Plant Protection Journal* (2011) 4: 35-43.
- MIMICA-DUKIĆ N.; KUJUNDŽIĆ S.; SOKOVIĆ M. & COULADIS, M. Essential oils composition and antifungal activity of *F. vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. *Phytother. Res.* (2003) 17(4), 368-371.
- MINISTÉRIO DE SAÚDE. Plano Estratégico de pré-eliminação do paludismo 2009 - 2013, *Ministério da Saúde, Direcção Geral de Saúde e Programa Nacional de luta contra o Paludismo, Cabo Verde* (2009). <http://www.rbm.who.int/countryaction/nsp/capVert.pdf>
- MONTEIRO, A.; PÓVOA, O.; MARINHO, S., E MONTEIRO, P. Os poejos na boa cozinha portuguesa, ISA press Lisboa (2007) 107.
- MORENO, ÂNGELA MARIA PEREIRA BARRETO DA VEIGA. Modelação hidrológica e da rega para condições de escassez visando a gestão da água em Santiago, Cabo Verde. Tese de Doutoramento (2013), Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, 213.
- MSAADA, K.; HOSNI, K.; TAARIT, M.B.; CHAHED, T.; KCHOUK, M.E.E & MARZOUK, M. Changes on essential oil composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruits during three stages of maturity. *Food Chem.* (2007) 102, 1131-4.

- MULLEN, G.R. E DURDEN, L. Medical and veterinary entomology. 2nd Edition. London: Academic Press (2009) 637.
- NATHAN, S.S. Effects of *Melia azedarach* on nutritional physiology and enzyme activities of the rice leaffolder *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* (2006) (84):98-108.
- NATHAN, S.S.; KALAIVANI, K. & MURUGAN, K. Effects of neem limonoids on the malaria vector, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Acta Trop* (2005) 96:47-55.
- NAUEN & BRETSCHNEIDER, T. New modes of action of insecticides. *Pesticide Outlook*. December (2002) 241-245.
- NDIONEL, R. D.; NIAYE, M., FAYE, O., AFOUTOU, J. M. & DIEYE, A. Larvicidal and cytopathologic effects of Suneem 1% (neem: *Azadirachta indica*, A. Juss, Meliaceae) on mosquitoes vectors of diseases RTopclass *Journal of Herbal Medicine* (2013) 2(3): 43-58.
- NEWALL, C.A., ANDERSON, L.A. & PHILLIPSON. Herbal medicines: A guide for health care professional. *The Pharmaceutical Press, London*, 296pp. Cit. por Mahboubi, M. and HAGHI, G., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J. Ethnopharm* (1996) 119: 325-327.
- NPGS/GRIN - *Mentha pulegium* information from NPGD/GRIN - Germplasm Resources Information Network (GRIN). in <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?24079>.
- OELRICHS, P.B.; HILL, M.W.; VALLELY, P. J.; MACLEOD, J.K. & MONLINSKY, T.F. Toxic tetranortriterpenes of the fruit of *Melia azedarach*. *Phytochemistry* (1983) 22(2): 531-4.
- OKUMU, F.; KNOLS, B. G.J. & FILLINGER, U. Larvicidal effects of a neem (*Azadirachta indica*) oil formulation on the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Malaria Journal* (2007) 6:63.
- ORCHARD, I. Octopamine in insects: neurotransmitter, neurohormone and neuromodulator. *Canadian of Journal Zoology* (1982) 60:659-669.
- ORCHARD, I.; LOUGHTON, B.C. & WEBB, R.A. Octopamine and short-term hyperlipaemia in the locust. *Genetic Endocrinology* (1981), 45:175-80. [http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480\(81\)90102-7](http://dx.doi.org/10.1016/0016-6480(81)90102-7).
- ÖZCAN, M. M; CHALCHAT, J.C.; ARSLAN, D., ATEŞ, A. & ÜNVER, A. Comparative essential oil composition and antifungal effect of bitter fennel

(*Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum*) fruit oils obtained during different vegetation. *J. Med. Food* (2006) 9(4): 552-61.

Padrón, B.; Oranday A.; Rivas C. e Verde, M. Identificación de compuestos de *Melia azedarach*, *Syzgium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum* com efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos. *Ciencia. UANL* (2003) 6(3):333-8.

PAREJO I.; JAUREGUI O.; SNCHEZ-RABANEDA F.; VILADOMAT F.; BASTIDA J. & CODINA C. Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography–negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* (2004) 52: 3679-87.

PARK, S. H. & SEONG, I. Antifungal effects of the extracts and essential oils from *F. vulgare* and *Illicium verum* against *Candida albicans*. *Korean J. Med. Mycol.* (2010) 15(4): 157-164.

PAVELA, R. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). *Phytother Res.* (2008) 22 (2): 274-278.

PAVLIDOU, V.; KARPOUHTSIS, I.; FRANZIOUS, G.; ZAMBETAKI, A.; SCOURASC, Z. & MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. Insecticidal and Genotoxic Effects of Essential Oils of Greek sage, *Salvia fruticosa*, and Mint, *Mentha pulegium*, on *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *J. Agric. Urban Entomol.* (2004) 21 (1): 39-49.

PENG, H. & MABBERLEY, D.J. *Melia azedarach* L., Sp. Pl. 1: 384. 1753, Cit. por Flora of China (2008) 11: 130-1.

PENG, H.; MABBERLEY, D.J.; PANNELLI, M.C.; EDMONSDS, J.M. & BARTHOLOMEW, B. Flora of China, 15- Meliaceae, *In*: Chen Shukun, ed., Fl. Reipubl. Popularis Sin. (1997) 43(3): 34-104.

PONESSA G.I. & PARRADO M.F. Caracterización anatomo foliar y aspectos etnobotânicos de *Sambucus nigra* L subsp peruviana (Kunth) R Bolli (Caprifoliaceae). *Acta Farm Bonaerence* (2001) 20(3):173-9.

PÓVOA, O. Produção e utilização dos taxa *Mentha pulegium* L. e *Mentha cervina* L. Tese. Universidade Técnica de Lisboa (2008).

PROENÇA DA CUNHA, A.; SILVA, A.P. DA & ROQUE, O.R. Plantas aromáticas em Portugal. Caracterização e utilizações (2007) Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian.

PURWANINGSIH, HARMIDA & BRINK, M. *Foeniculum vulgare* Miller. *In*: de Guzman, C.C. e Siemonsma, J.S. (Eds). *Plant resources of South-East Asia*, No. 13: *Spices*. Leiden, The Netherlands, Backhuys Publisher (1999) 126-130.

- RASHEED, M.; AFSHAN, F.; TARIQ R. M.; SIDDIQUI B.S.; GULZAR T.; MAHMOOD A.; BEGUM, S. & KHAN, B.,” Phytochemical Studies on the Seed Extract of *Piper nigrum* Linn”. *Nat. Prod. Res.* (2005) 19(7): 703-712.
- REGNAULT-ROGER, C. The potential of botanical essential oils for insects pest control. *Integrated Pest Management Reviews* (1997) 2:25-34pp. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1018472227889>.
- RENJIE, L.; ZHENHONG, L. & SHIDI, S. GC-MS analysis of fennel essential oil and its effect on microbiology growth in rats’ intestine. *Afr. J. Microbiol. Res.* (2010) 4, 1319-1323.
- REYNOLDS, J.E.F. Essential Oils and Aromatic Carminatives, Martindale-The Extra. *Pharmacopeia* (1982) 670-676.
- RIBEIRO, H., H.C. RAMOS, R.A. CAPELA, & C.A. PIRES. Os mosquitos de Cabo Verde (Diptera: Culicidae) - sistemática, distribuição, bioecologia e importância médica. *Junta de Investigações Científicas do Ultramar* (1980) Lisboa 141.
- RICHARD, O.W. & DAVIES, R.G. Imm’s General Textbook of Entomology - Classification and Biology. 10 th Edition (1997) Vol.2. New York: Chapman & Hall.
- RIM, I. S. & JEE, C. H. Acaricidal effects of herb essential oils against *Dermatophagoides farina* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) and qualitative analysis of a herb *Mentha pulegium* (pennyroyal). *Korean J. Parasitol* (2006) 44 (2): 133-8.
- ROBERTSON, A. & JUORIS, A.V. Octopamine and some related noncatecholic amines in invertebrate nervous system. *International of Reviews Neurobiology* (1976) 19:173-224. [http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742\(08\)60704-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7742(08)60704-7).
- ROCHA, D.K.; GRÁCIO, A.S. & MATOS, O.C. Importância das Plantas Aromáticas Medicinais nas Novas Estratégias de Controlo de Vectores da Malária. *Actas do Workshop "Plantas Medicinais e Práticas Fitoterapêuticas nos Trópicos"*. IICT. (2008). Acedido em Outubro de 2012. http://www2.iict.pt/archive/doc/O_Matos_wrkshp_plts_medic.pdf.
- ROCHA, F. *Nomes vulgares de plantas existentes em Portugal*. Protecção da Produção Agrícola. Lisboa, Direcção-Geral de Protecção das Culturas (1996).
- ROCHA, D.K., MATOS, O.C. & GRÁCIO, A.S. Insecticidal properties of tropical and temperate plants on mosquito malária vector. *TM & IH, Tropical Med. & Inter. Health*, (2007) 12 (1): 249 (POSTER).

- ROCHA, M.V.L., DIARA KADY. Abordagem aos Métodos de Controlo de Vectores da Malária: Estudos dos Efeitos Biocidas de *Thevetia peruviana* Schum., em *Anopheles atroparvus* van Thiel, 1927 (DIPTERA, CULICIDAE). Tese de Mestrado (2003) Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- ROLL BACK MALARIA (RBM/WHO). RBM Advocacy Guide. Geneve, *World Health Organization* (2000).
- RORIZ-CRUZ, M.; SPRINGZ, E.; ROSSET, I.; GOLDANI, L. & TEIXEIRA, M., G. Dengue and Primary Care: a Tale of two Cities. *Bulletin of the World Health Organization* (2010) 88: 244-5.
- RUBIOLO P.; B. SGORBINI; LIBERTO E.; CORDERO, C. & BICCHI C. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. *Flavour and Fragrance Journal* (2010) 25:282-90.
- RUPPERT, E.E. & BARNES, R.D. Zoologia dos Invertebrados, 6^{ed}. Editora Roca Ltda SP, Brasil (1996) 1029.
- RUSSEL, G.B. Phytochemical Resources for Crop Protection. *New Zealand Journal of Technology* (1986)2: 127-134.
- SACHS J. & MALANEY, P. The Economic and Social Burden of Malaria. *Nature*, (2002) 415: 680-685.
- SAKULKU, U.; NUCHUCHUA, O.; UAWONGYART, N., PUTTIPIPATKHACHORN, S.; SOOTTITAWAT, A. & RUKTANONCHAI, U. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. *International Journal of Pharmaceutics* (2009) 372(1-2):105-11.
- SALGUEIRO, J. *Ervas, usos e saberes. Plantas medicinais no Alentejo e outros produtos naturais*. 3^a Edição (2005). Lisboa, Colibri.
- SANGWAN, N.S.; FAROOQI, A. H. A.; SHABIH, F. & SANGWAN, R. S. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regulation* (2001) 34: 3-21.
- SCALBERT, A. & HASLAM, E. Polyphenols and chemical defence of the leaves of *Quercus robur*. *Phytochemistry* (1987) 26 (12): 3191-5.
- SCHMUTTERER, H. Potential of Azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. *J Insect Physiol* (1988) 34:713-9.
- SCHOLTE, E-J., KNOLS, B.G.J., SAMSON, R.A. & TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of Insect Science* (2004) 4: 19.

SCHOLTE, E-J., KNOLS, B.G.J., SAMSON, R.A. & TAKKEN, W. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *Journal of Insect Science*, (2004) 4: 19.

SCHOLTE, E-J., TAKKEN, W. & KNOLS, B.G.J. Pathogenicity of five East African entomopathogenic fungi against adult *Anopheles gambiae* s.s mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society (NEV)* (2003) 14, 25-9.

SCHOLTE, E-J., TAKKEN, W. & KNOLS, B.G.J. Pathogenicity of five East African entomopathogenic fungi against adult *Anopheles gambiae* s.s mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Proceedings of the Section Experimental and Applied Entomology of the Netherlands Entomological Society (NEV)* (2003) 14, pp.25-29.

SCOTT, J. G. Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (1999) 29(9), PP.757-777.

SEIXAS, GONÇALO F.R. *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera, Culicidae) da ilha da Madeira: origem geográfica e resistência aos insecticidas. Tese de Mestrado, IHMT /UNL, Lisboa (2012).

SEN, A. & BATRA, A. Chemical composition of methanol extract of the leaves of *Melia azedarac* L, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* (2012) 5 (3) 42-5pp.

SERVICE, M.W. A Guide to Medical Entomology. 1st Edition. London: The Macmillan (1980) 248.

SERVICE, M.W. *Lecture notes on medical entomology*. Blackwell Scientific, Oxford (1986) 272.

SERVICE, M.W. *Medical entomology for students* (4th Ed.). Cambridge University Press, Cambridge (2008) 306.

SHAALAN, E.; CANYON, D.V., YOUNES, M., ABDELWAHAB, H. & MANSOUR, A. (2005). A review of botanicals with mosquitocidal potential. *Environment International* 31:1149-1166.

SHAHAT, A.; IBRAHIM, A.Y.; HENDAWY, S.F.; OMER, E.A.; HAMMOUDA, F.M.; ABDEL-RAHMAN, F.H. & SALEH, M.A. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules* (Basel, Switzerland) (2011) 16(2):1366-77.

SHARMA, P.; MOHAN, L. & SRIVASTATA, C.N. Phytoextract-induced Developmental Deformities in Malária Vector. *Bioresour Thechnol* (2006) 97(14): 1599-604.

- SHRAVAN K. M. & KANNAPPAN N. *in vivo* antidiabetic evaluation of neem leaf extract in alloxan induced rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* (2011) 7, 100-105.
- SHIRAZI, F. H.; AHMADI, N. & KAMALINEJAD, M. Evaluation of Northern Iran *Mentha pulegium* L. cytotoxicity. *Daru*, 12: 106-110. Cit. por MHBOUBI, M. and HAGHI, G., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *J. Ethnopharm* (2004) 119: 325-327.
- SIHUINCHA, M.; ZAMORA-PEREA, E.; ORELLANA-RIOS, W.; STANCIL, J.D.; LÓPEZ-SIFUENTES, V., VIDAL-ORÉ, C. & DEVINE, G.J. Potencial use of pyriproxyfen for control of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Iquitos, Peru. *Journal of Medical Entomology* (2005) 42(4):620-630.
- SILVERSTEIN, R.M. Pheromones: background and potential for use in insect pest control. *Science* (1981) 213: 1326-31.
- SIMAS, N.K., COSTA-LIMA, E., CONCEIÇÃO, S.R., KUSTER, R.M., OLIVEIRA-FILHO, A.M. & SALGUEIRO-LAGE, C.L. Natural Products for Dengue Transmission Control - Larvicidal Activity of *Myroxylon balsamum* (red oil) and of Terpenoids and Phenylpropanoids. *Quím. Nova* (2004) 279.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. Porto Alegre: editora UFRGS (2007) 1104.
- SINGH, G.; MAURYA, S.; DE LMP & CATALAN, C. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *F. vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control* (2006) 17(9): 745-752.
- SINGH, K., SINGH, A. & SINGH D.K. Molluscidal activity of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *J Ethnopharmacol* (1996) 52: 35-40.
- SISTERSON, M. S., ROUSH, R. T.; SHELTON, A. M. & ZHAO, J-Z. Insect Resistance to Transgenic Bt Crops: Lessons from the Laboratory and Field. *J. Econ. Entomol* (2003) 96(4): 1031-38.
- SITHISARN, P.; SUPABPHOL R. & GRITSANAPAN, W. Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209), *J. Ethnopharmacol* (2005) 99(1): 109-12.
- SODERLUND, D. M. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Management Science* (2008) 64(6): 610-616.
- SOUSA, L. A.; ALBUQUERQUE, J. C. R.; LEITE, M. N. & STEFANINI, M. B. Sazonalidade dos ductos secretores e óleo essencial de *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* Mill. (Apiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* (2005) 15(2): 155-161.

- SOUSA, O.F.R.M.; ROCHA, D.K., FERREIRA, M. F., & GRÁCIO, A. J. Larvicidal activity of Wild Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. Var. *vulgare*) Essential Oils against a European Malaria Vector *Anopheles atroparvus* Van Thiel (Diptera, Culicidae). 8th Phytochemical Society of Europe (PSE) Meeting on Biopesticides and 2nd RSEQ-Grupo Especializado de Química de Productos Naturales (GEQPN). La Palma, Canary Islands, Spain (2009).
- SOUZA, E.C.P.M. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. In: Nascimento, IA, Souza ECPM, Nipper M. Métodos de ecotoxicologia marinha. São Paulo: Edit. Artes Gráficas (2002) 9-14.
- SRIVASTAVA, A. K.; SRIVASTAVA, S. K. & SYAMSUNDAR, K.V. Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. *Flavour Fragr. J.* (2005) 20:51-53.
- SRIVASTAVA, S. K. & GUPTA, H. O. New limonoids from the roots of *Melia azedarach*. Linn. *Indian Journal of Chemistry* (1985) 24B: 166-170.
- SUKUMAR, K.; PERICH M.J. & BOOBAR, L.R. Botanical Derivatives in Mosquito Control: A Review. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* (1991) 7: 210-237.
- SYLLA, M.; BOSIO, C.; URDANETA, M., L.; NDIAYE, M. & BLACK, W.C. Gene Flow, Subspecies Composition, and Dengue Virus-2 Susceptibility among *Aedes aegypti* Collections in Senegal. *PLOS, Neglected Tropical Disease* (2009) 3 (4):e408.
- TABANCA, N.; DEMIRCI, B.; KIYAN, H.T.; ALI, A.; BERNIER, U.R.; WEDGE, D.E.; KHAN, I.A. & BASER, K.H.C. Repellent and larvicidal activity of *Ruta graveolens* essential oil and its major individual constituents against *Aedes aegypti*. *Planta Med* (2012):78-90.
- TABASHNIK, B. E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* (1994) 39: 47-79pp.
- TABASSUM, R., NAQUVI SNH, JAHAN M. & KHAN MZ. Toxicity and abnormalities produced by plant products against *Culex fatigans*. *Proc. Pak Cong Zool* (1993) 13: 387-393.
- TDR/WHO. Training in Tropical Disease. *Malaria Fact Sheet*, Geneva (2002).
- TELICI, I.; TONCER, O.G. & SAHBAZ, N. Yield, Essential oil content and composition of *Coriandrum sativum* cultivars (var. *vulgare* Alef. and var. *microcarpum* DC.) grown in two different locations. *J. Essent. Oil Res.* (2006) 18, 189-193.
- THOMAS, D.D., DONNELLY, C.A., WOOD, R.J. & ALPHEY, L. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science* (2000) 287(5462):2474-76.

- THOMAS, M.B. & READ, A.F. Can fungal biopesticides control malaria? *Nature Reviews Microbiology* (2007) 5(5):377-383.
- TIME LIFE PLANT ENCYCLOPEDIA VIRTUAL GARDEN, 1999.
<http://www.librarything.com/series/timelife+encyclopedia+of+gardening>
- TINOCO, M.T.; MARTINS, M.R. & CRUZ-MORAIS. Actividade antimicrobiana do óleo essencial do *Foeniculum vulgare* Miller *Rev. de Ciências Agrárias* (2007) (30)1: 448-54.
- TRABOULI, A. F.; EL-HAJ, S.; TUENI, M., TAOUBI, K., NADER, N.A. & MRAD, A. Repellency and toxicity of aromatic plant extracts against the mosquito *Culex pipiens molestus* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag. Sci.* (2005) 61(6): 597-604.
- VAN DEN BERG, H. Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. *Environmental Health Perspectives* (2009) 117(11):1656-63.
- VATANDOOST, H. & HANAFI-BOJD, A.A. Laboratory evaluation of 3 repellents against *Anopheles stephensi* in the Islamic Republic of Iran. *La Revue de Santé de la Méditerranée orientale* (2008) 148(2):260-7.
- VATANDOOST, H., ABAI, M.R., ABBASI, M., SHAEGHI, M., ABTAHI, M. & RAFIE, F. Designing of a laboratory model for evaluation of the residual effects of deltamethrin (K-othrine WP 5%) on different surfaces against malaria vector, *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Journal of Vector Borne Diseases* (2009) 46(4):261-7.
- VEERAPHANT, C.; MAHAKITTIKUN, V. & SOONTHORNCHAREONNONL. Acaricidal effects of Thai Herbal Essential oils. *J. Pharmaceutical Science* (2011) 38 (3-4): 1-12.
- VERKERK, R.H. J. & WRIGHT, D.J. Biological activity of neem seed kernel extracts and synthetic azadirachtin against larvae of *Plutella xylostella* L. *Pestic. Pest. Sci.* (1993) 37: 83-91.
- VISHNUKANTA, A. C. R. *Melia azedarach*: A phytopharmacological review. *Phcog Rev: Plant Rev.* (2008) 2(3):173-9.
- WARRELL, D.A. & GILLES, H.M. Essential malariology. 4th Edition. London: Hodder Arnold. (2002) 384 pp.
- WEISSHAAR, B. & JENKINS, G.I. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Current Opinion in Plant Biology* (1998) 1:251-7p.
- WHITE, G.B. *Anopheles gambiae* Complex and Disease Transmission in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*(1974) 68: 278-301pp.

WHO. World Malaria Report 2012. Disponível em: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/index.html (acedido a 02 de maio de 2013).

WHO. Dengue, guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. 3 (2009) pp.59-86.

WHO. Guidelines for Laboratory and Field Testing of Mosquito larvicides. Communicable Disease Control, Prevention and Eradication. WHO Pesticide evaluation scheme (2005) 39.

WHO Expert Communicable on Malaria, *20th Report*, WHO Geneva (2000).

WHO. Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vectors, bio-efficacy and persistence of insecticides on treated surfaces. WHO (1998) Geneva, Switzerland (28-30 September).

WHO. *Dengue Haemorrhagic Fever Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. 2nd edition (1997) Geneva.

WHO, Features. *Office Information*, nº 174 (1994).

WHO. “Résistance aux insecticides et lutte antiuvectorielle”. *Techn. Rep. Ser.*, Nº443. (1970) Genève.

WHO. Criterios e interpretacion de las pruebas para determinar la susceptibilidad o la resistencia de los insectos a los insecticidas. Serie de Informes Técnicos, nº 443. (1970) Geneva.

WHO. Vector resistance to insecticides. *15 th Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control. World Health Organization Tech Rep. Ser.*, (1992) 818: 1-62.

WILLIAMS, C.R.; BADER, C.A.; KEARNEY, M.R.; RITCHIE, S.A. & RUSSEL, R.C. The extinction of dengue through natural vulnerability of its vectors. *PLoS Neglected Tropical Diseases* (2010) 4(12): e922.

WONG, J.; STODDARD, S.T.; ASTETE, H.; MORRISON, A.C. & SCOTT, T.W. Oviposition site selection by the dengue vector *Aedes aegypti* and its implications for dengue control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. (2011) 5(4): e1015.

YAMASAKI, B. R.; RITLAND, T. G.; BARNBY, M. A. & KLOCKE, J. A. Isolation and purification of salannin from neem seeds and its quantification in neem and chinaberry seeds and leaves. *Journal of Chromatography* (1998) 447: 217-283.

ZAIM, M. & GUILLET, P. Alternative insecticides: an urgent need. *Trends in Parasitology* (2002) 18(4):161-163.

ZARGARI, A. Herbal Medicines, *Publication of Tehran University*, Tehran. (1990) 14-18.

ZOUBIRI S.; BAALIOUAMER A.; SEBA N. & CHAMOUNI N. Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *F. vulgare* seed essential oil. *Arab. J. Chem.*, (2011). DOI: 10.1016/j.arabjc.2010.11.006.

Endereços consultados na Internet:

- (1) <http://www.clubesanguebom.com.br/tsdoacao/>, acessado a 30 de Julho de 2013.
- (2) <http://map2.zoo.ox.ac.uk/browse-resources/multiple>, acessado em julho de 2013, (vectors/dominant_malaria_vectors/world/. in Sinka *et al.*, Parasites & Vectors, 2012).
- (3) <https://www.msu.edu/~mosquito/Walker/malaria.html>, acessado em 27 de Setembro de 2013.
- (4) <http://www.who.int/ith/en/>, acessado em 20 de Abril de 2013.
- (5) http://www.ceibal.edu.uy/UserFiles/P0001/ODEA/ORIGINAL/101112_dengue_prevencion3.elp/conociendo_al_aedes_aegypti.html, acessado a 05 de Julho de 2013.
- (6) <http://www.florestar.net/sabugueiro/sabugueiro.html>, acessado em 2013.
- (7) <http://bagasabugueiro.blogspot.pt/2006/12/caractersticas-e-propriedades.html>.
- (8) <http://jb.utad.pt/flora>>. Acessado em julho 2013.
- (10) http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=10555>. Acessado em 2012 e 2013.
- (11) www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=10015>. Acessado em 2012 e 2013.
- (12) http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/12_140_19_Mentha.pdf>. Acessado em 2012 e 2013.
- (13) http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=10476. Acessado em 2012 e 2013.
- (14) <http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/>. Acessado em 2012 e 2013.
- (15) <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxgenform.pl?language=pt>. Acessado em 2012 e 2013.
- (16) <http://www.scielo.gpeari.mctes.pt/pdf/rca/v30n1/v30n1a47.pdf>. (Acesso em julho de 2013.

- (17) <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>; Acedido em agosto de 2013.
- (18) <http://www.paraconstrucaocivil.com/wp-content/uploads/2012/04/Mapa-de-cabo-verde.gif>, acedido em 20 de junho de 2013.
- (19) <http://www.fao.org/tc/cplpunccd/paginas-nacionais/cabo-verde/contexto-nacional-da-gst-de-cabo-verde/en/>, acedido em 2013.
- (20) <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABTUwAF/metodos-extracao?part=2>.
- (21) http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/47/Tlc_sequence.png, acedida no dia 06 de Junho de 2013.

Anexo I
Cromatografias

I.1 Princípio da cromatografia em coluna (CC)

Cromatografia em coluna (CC) consiste numa coluna de vidro, metal ou plástico, preenchida com um adsorvente adequado. O adsorvente pode ser colocado diretamente (seco) na coluna ou suspenso em um solvente (geralmente o próprio eluente a ser usado no processo de separação). Os principais adsorventes normalmente utilizados são a sílica gel (utilizado no caso de estudo), a alumina, o carbonato de cálcio, o óxido de magnésio, o carvão ativado, a sacarose e o amido, entre outros.

A substância a ser separada ou analisada é colocada na coluna pela parte superior e o eluente é posteriormente vertido, em quantidade suficiente para promover a separação. A coluna pode ser um simples tubo de vidro, aberto em ambas as extremidades, ou tubo semelhante a uma bureta. Em alguns casos aplica-se vácuo pela parte inferior da coluna ou uma ligeira sobrepressão pela parte superior da mesma.

Quando a amostra a ser cromatografada possui cor, pode-se visualizar as diferentes zonas coloridas descendo pela coluna, que são recolhidas, separadamente, pela extremidade inferior.

Quando a amostra não possui cor, recolhem-se várias frações iguais de eluente, testando-as quanto à presença ou não de substâncias dissolvidas através do uso de reveladores adequados (luz UV, reveladores químicos entre outros).

I.2 Protocolo de Cromatografia CC

Primeiro coloca-se numa coluna (60 cm de altura / 2,5 de diâmetro) 0,5 cm de areia;

- 1- Enche-se a coluna com sílica gel até 2/3 de altura e compacta-se com diclorometano, sob pressão de corrente de azoto. Acima da sílica coloca-se aproximadamente 2 cm de areia para evitar que a coluna seque e também para nivelá-la;
- 2- Após a compactação aplica-se aproximadamente 200 gr (100 ml de acetato de etilo e 100 ml de etanol) de extrato diluído num volume mínimo de metanol.
- 3- Recolhe-se as frações pela cor em tubos de ensaio previamente numerados.

Anexo II
Protocolos dos testes de sensibilidade

II.1 Procedimento geral adotado para a determinação da sensibilidade das larvas de *Ae. aegypti* e *An. arabiensis* (WHO, 1981 [a, b])

- Prepararam-se recipientes com 225 ml de água, devidamente identificados, para os respectivos produtos e concentrações a testar, e um recipiente para o grupo controlo.
- Prepararam-se as diluições dos diferentes produtos, e a cada recipiente adicionou-se uma alíquota do produto, de modo a obter as concentrações desejadas começando sempre pela concentração mais baixa.
- Misturaram-se bem os produtos com água durante cerca de 30 segundos e deixaram-se em repouso durante 15 minutos.
- Ao lado de cada recipiente colocou-se uma placa de Petri contendo 25 ml de água destilada e 25 larvas do mesmo estágio.
- Juntaram-se a cada recipiente os 25 ml de água mais 25 larvas de cada uma das placas de Petri referidas com os 225 ml de água. Preparou-se um recipiente só com água e as larvas para controlo. Foram ainda preparados controlos do ensaio larvar com solvente ou tensioativo.
- Deixaram-se em repouso durante 24 horas fazendo-se então observações e registo das mortalidades e morbilidades.

Anexo II.2 Procedimento geral adotado para a determinação da sensibilidade dos adultos de *Ae. aegypti* e *An. arabiensis*

Nos primeiros ensaios pretendeu-se determinar as concentrações letais dos óleos essenciais, variando as concentrações dos tubos 1-4 por ordem crescente e fixando o tempo de observação (1h, definido pela OMS).

- 1- Utilizando o tubo aspirador (Figura II.1- A,B) foram introduzidos 25 mosquitos (fêmeas com 2-4 dias de vida) através do orifício circular menor da tampa corrediça (Figura II.1 C), em cada um dos 4 tubos de observação (com pinta verde), numerados de 1 a 4, bem como no respetivo tubo do controlo, C (Figura II.1 -F).
- 2- Durante cerca de 1 hora, verificou-se se estão todos em boas condições; se não for o caso, substituir os que for necessário.
- 3- Ao fim deste tempo, mudar os mosquitos para os tubos de exposição (com pinta vermelha), também numerados de 1 a 4, enroscando-os nos tubos de observação (Figura II.1 D) e fazendo passar os insetos pela maior abertura circular da tampa corrediça, invertendo a posição relativa dos tubos e soprando levemente; fechar a tampa corrediça e desenroscar os dois tubos (Figura II.1 E).
- 4- Tomar nota do tempo (hora) do início da exposição para cada um dos tubos.
- 5- Mudar novamente os mosquitos para os tubos de observação, seguindo a mesma ordem e adotando a mesma técnica de transferência, como segue:
Do T. de exp.1 para o respetivo T. de obs.1, ao fim de 60 min.;
Do T. de exp.2 para o respetivo T. de obs.2, ao fim de 60 min.;
Do T. de exp.3 para o respetivo T. de obs.3, ao fim de 60 min.;
Do T. de exp.4 para o respetivo T. de obs.4, ao fim de 60 min.;
Logo de seguida, mudar também os insetos do primeiro para o segundo tubo de controlo.
- 6- Deixar em repouso 24 horas, com algodão humedecido com soluto de sacarose a 10% sobre a rede de cada um dos tubos de observação (Figura II.1 C).
- 7- Após 24 horas de repouso, fazer a contagem dos insetos mortos, moribundos e vivos em cada um dos 5 tubos (4 das exposições, correspondentes a 4 concentrações diferentes mais 1 controlo).

Para este estudo também foi efetuado o mínimo de 3 réplicas.

Anexo II.2 Procedimento geral adotado para a determinação da sensibilidade dos adultos de *Ae. aegypti* e *An. arabiensis*

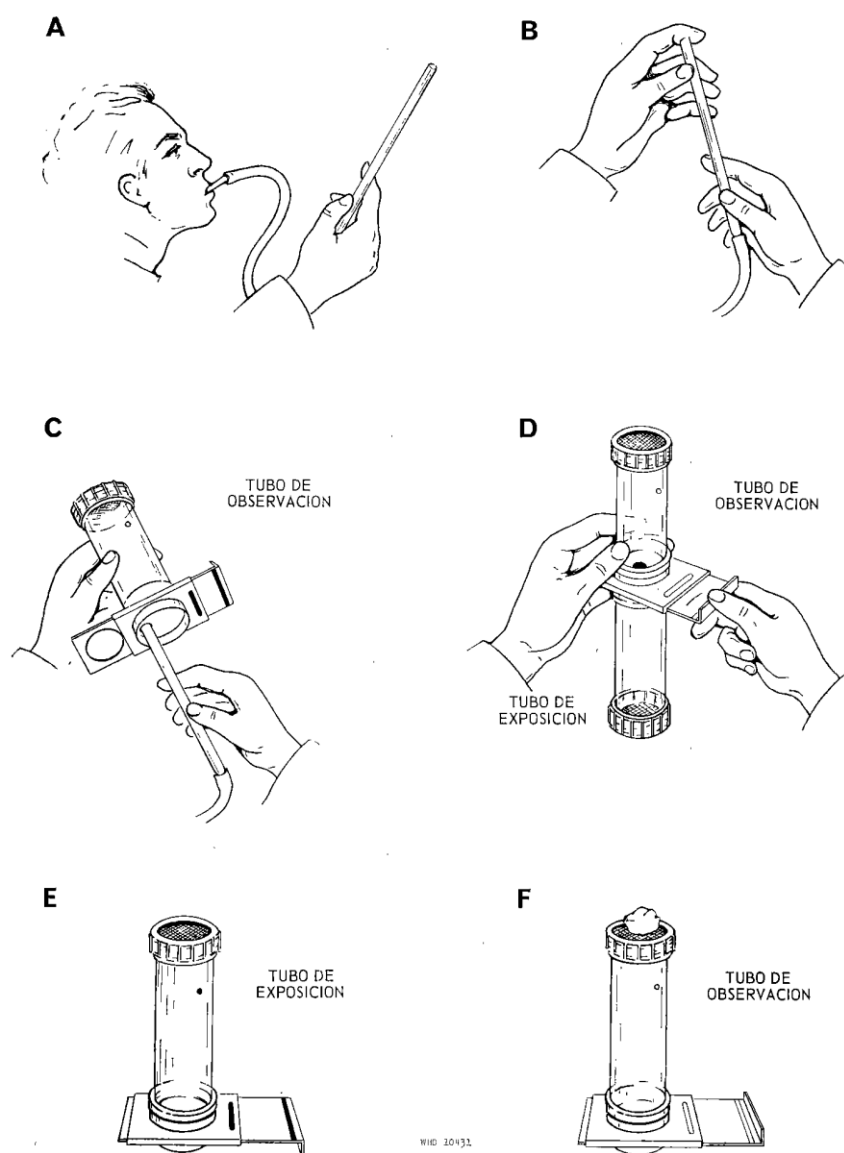


Figura II.1 - Procedimento geral adotado para a determinação da sensibilidade dos adultos de *Ae. aegypti* e *An. arabiensis*, adaptado de WHO, 1970.

Anexo III
Análise da Cromatografia CCF e CC do extrato *S. nigra*
(EtOH eEtOAc)

Tabela III.1 - Misturas de solventes do extrato *S. nigra* EtOH, na Cromatografia em coluna.

Mistura de Solventes (%)	<i>S. nigra</i> EtOH Tubos	Cor das amostras
n- Hexano 100	T1-3 (T1 eliminado)	Amostra 2 -Amarelo
Clorofórmio 100	T4	Amostra3-5-Branco
Clorofórmio-Acetato de etilo -75:25	T5-9	Amostra 6-7-Branco
Clorofórmio- Acetato de etilo -50:50	T10-16	Amostra 8-9-Esverdeado
Acetato de etilo -25:75	T17-20	Amostra 10-12-Verde-escuro
Acetato de etilo - 100	T21-23	Amostra 13-15 -Verde
Acetato de etilo-Metanol -75:25	T24-27	Amostra 16-18-Verde claro
Acetato de etilo -Metanol -50:50	T28-29	Amostra 19-21-Verde claro
Acetato de etilo-Metanol -25:75	T30	Amostra 22-30-Verde-claro
Metanol 100	T31	Amostra31 (eliminada)

Tabela III.2 - Misturas de solventes do extrato *S. nigra* EtOAc, na Cromatografia em coluna.

Mistura de Solventes (%)	<i>S. nigra</i> EtOAc Tubos	Cor das amostras
n- Hexano 100	T1-3 (A1 eliminada)	Amostra 2-3 -Amarelo
Clorofórmio: n-Hexano 20:80	T5	Amostra4-5-Amarelo claro
Clorofórmio: n-Hexano 40:60	T6	Amostra 6-15-Muito Amarelo
Clorofórmio: n-Hexano 60:40	T7-11	Amostra 16-Branco
Clorofórmio 100	T12	Amostra 17-Branco
Clorofórmio: Acetato de etilo 80:20	T13-15	Amostra 18 -Verde
Clorofórmio: Acetato de etilo 60:40	T13-15	Amostra 19-20 -Verde escuro
Clorofórmio: Acetato de etilo 40:60	T13-15	Amostra 21-23-Amarelo
Clorofórmio: Acetato de etilo 20:80	T16-19	Amostra 24-26-Amarelo escuro
Acetato de etilo 100	T20-23	Amostra27 -Verde escuro
Metanol : Acetato de etilo 20:80	T24-31	Amostra 28-30- Amarelo
Metanol : Acetato de etilo 40:60	T32	Amostra 31-38- Verde claro
Metanol : Acetato de etilo 60:40	T33-36	-
Metanol 100	T37-38	-

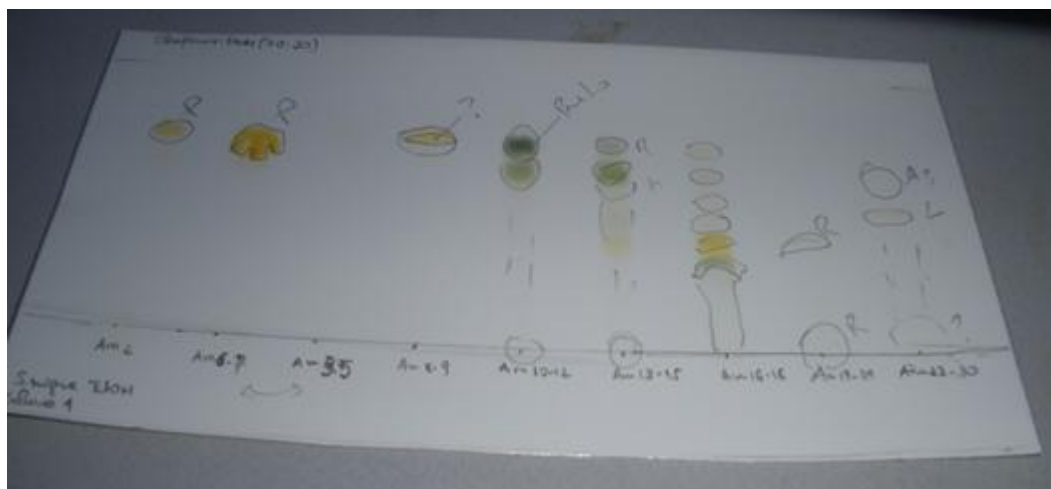


Figura III.1 - Perfil cromatográfico das nove frações de extrato de etanol de *S. nigra*, no sistema clorofórmio: acetato de etilo (70:30).

Anexo IV
Espectros do CG-EM dos óleos essenciais

IV. 1 Espectro de GC-EM do OE de *M. pulegium* de Cabo Verde e Portugal

Mentha pulegium

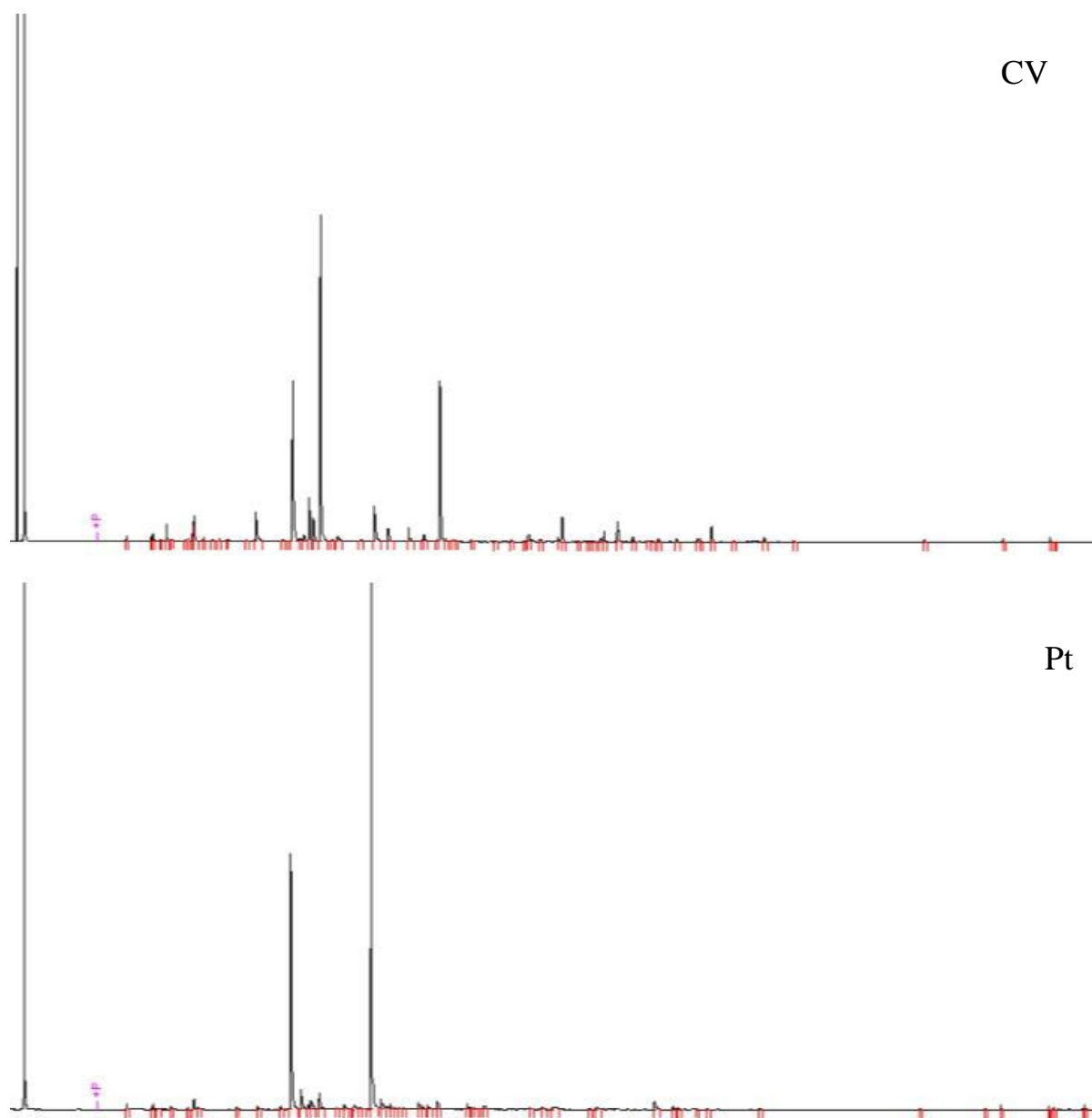


Figura IV. 1 - Espectro de GC-EM do OE de *M. pulegium* de Cabo Verde (CV) e Portugal (Pt).

IV. 2 Espectro de CG-EM do OE de *F. vulgare* de Cabo Verde e Portugal

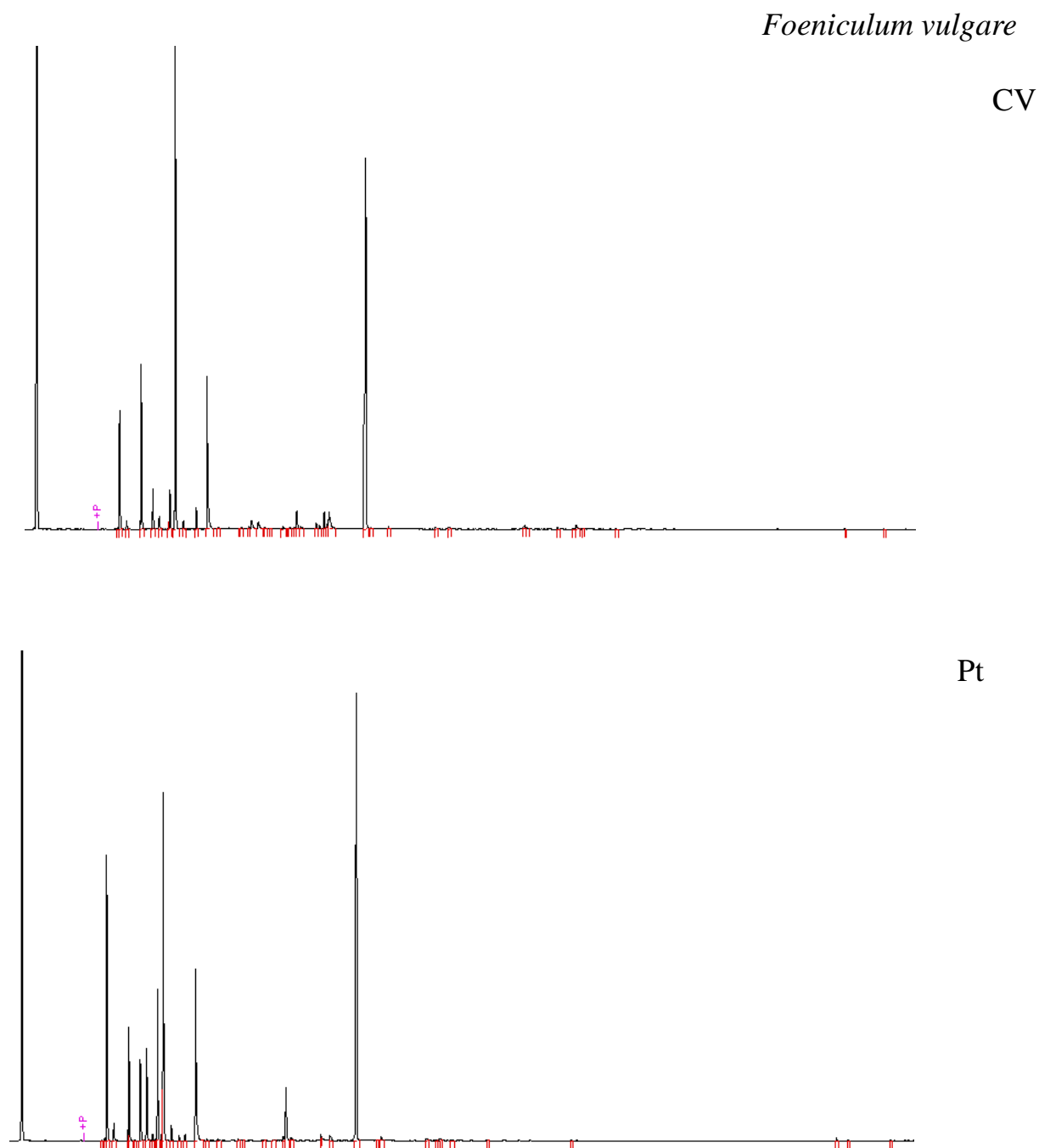


Figura IV. 2 - Espectro de CG-EM do OE de *F. vulgare* de Cabo Verde e Portugal.

Anexo V
Espectros de ^1H e ^{13}C de RMN dos óleos essenciais

V. 1 Espectro de RMN do OE de *M. pulegium* de Portugal

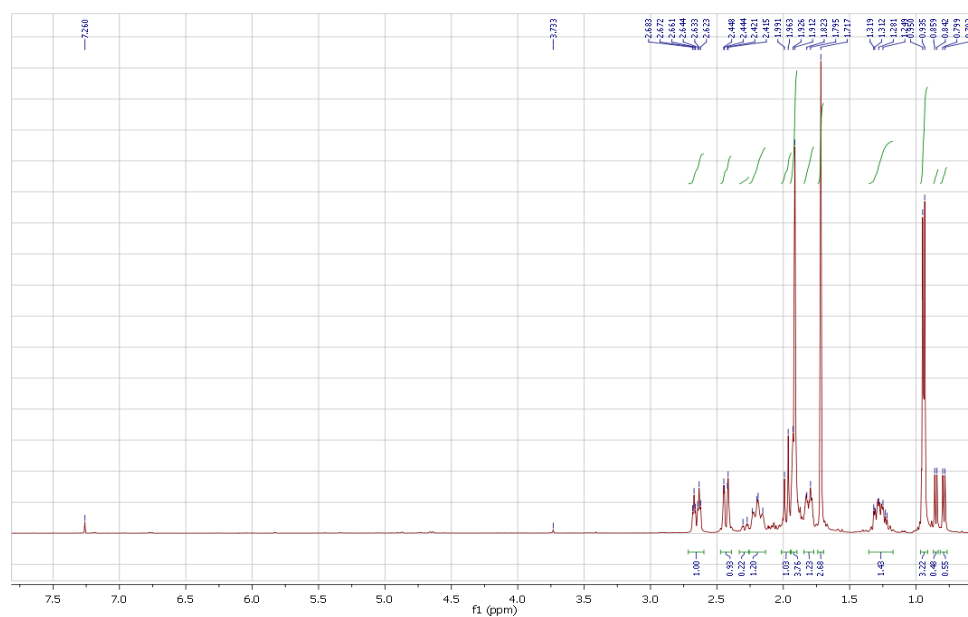


Figure V.1 - Espectro ^1H RMN do OE de *M. pulegium* a 400 MHz (1- Pulegona; 2 - Mentona).

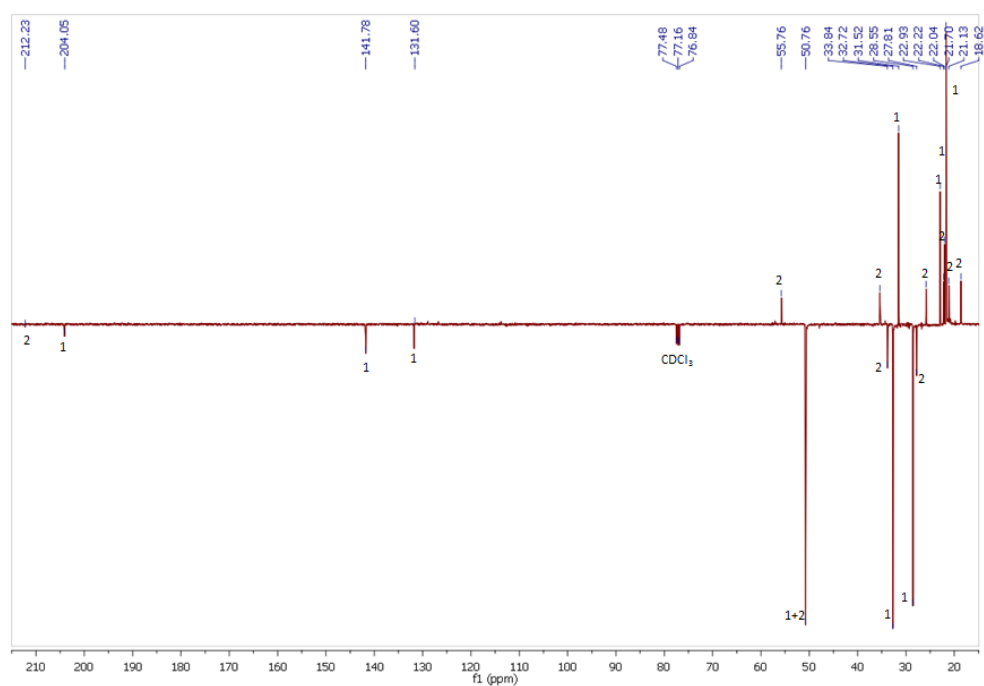


Figure V.2 - Espectro de RMN de ^{13}C do OE de *Mentha pulegium* a 400 MHz, (1- Pulgona; 2- Mentona).

V. 2 Espectro de RMN do OE de *F. vulgare* de Cabo Verde

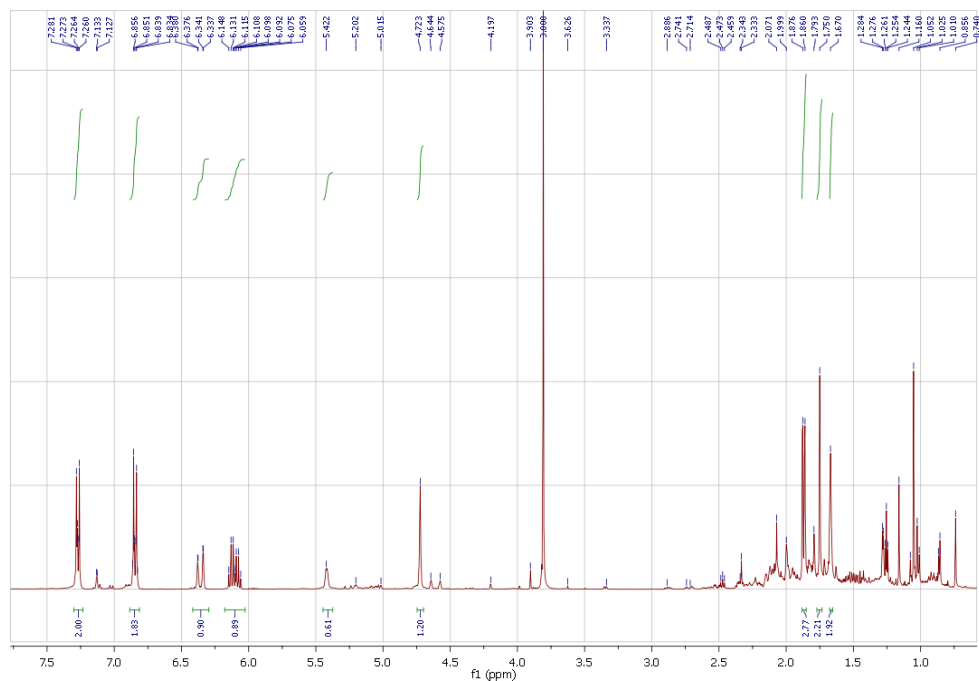


Figura V.3 - Espectro ^1H RMN do óleo essencial de *F. vulgare* de Cabo Verde a 400 MHz (4- *trans*- Anetole; 5- Limoneno).

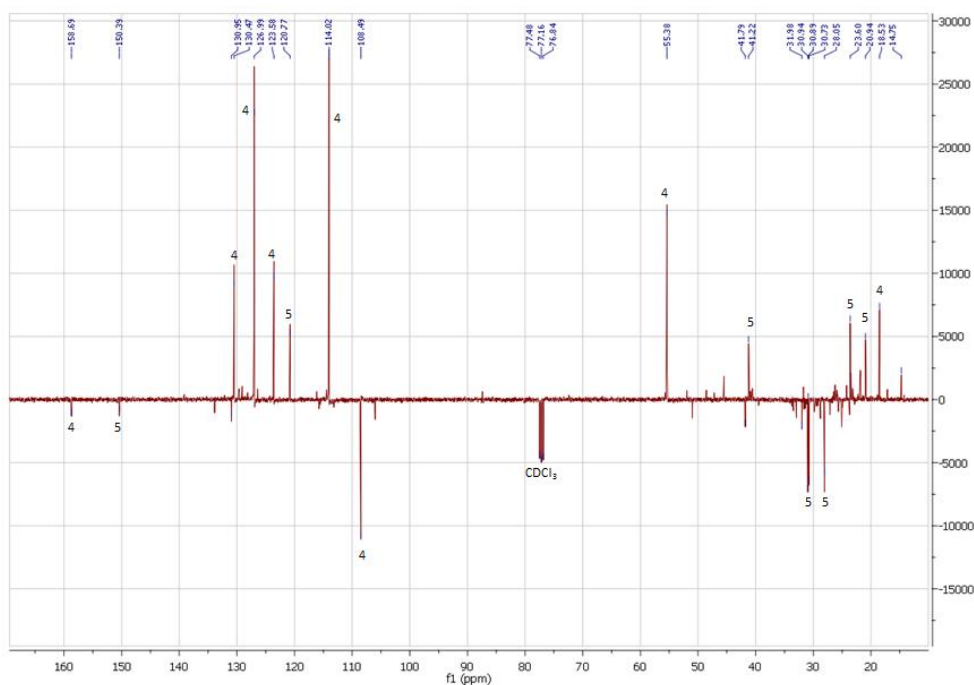


Figura V.4 - Espectro de RMN de ^{13}C do OE de *Foeniculum vulgare* a 400 MHz, (4- *trans*- Anetol; 5- Limoneno).

Anexo VI

Bioensaios larvicidas com os extratos das meliáceas

Tabela VI.1 - Registo das mortalidades observadas nas larvas do 3º estágio do *Ae. aegypti*, 24 horas após o contacto com extrato bruto de *M. azedarach*.

$\mu\text{l}/250\text{ml}$	Mort. observada	Mort Corrigida	Total
32,5	46	42,6	100
35	65	62,8	100
37,5	76	74,5	100
50,0	93	92,6	100
Controlo (n-Hexano 50)	6	-	100

A partir de uma solução “stock” de 100mg/ml de *M. azedarach*, foi efetuado o ensaio larvicida segundo estas diluições, previamente otimizadas, de modo a minimizar o efeito de toxicidade do solvente. Nas réplicas seguintes a este ensaio, em que tudo parecia ter decorrido dentro da normalidade, os resultados sofreram enorme alteração inviabilizando os resultados uma análise estatística robusta conforme preconizado pela OMS para este tipo de ensaio.

Em relação ao extrato de *A. indica* foi preparado uma solução “stock” de 50 mg/ml, a partir do qual foram testados (850,0; 950,0; 1050,00; 1150,0 μl) de extrato com atividade larvicida variável entre 12 e 72 % nos primeiros ensaios, mas estas mortalidades sofreram drásticas alterações nos ensaios subsequentes, efetuados em condições idênticas aos dos ensaios anteriores.

Anexo VII

**Bioensaios larvicidas com os extratos de *S. nigra* em acetato de etilo e
com óleos essenciais de *M. pulegium* e *F. vulgare***

VII.1 Resultado da análise de Pearson ao modelo “probit” aplicado ao bioensaio com extrato em acetato de etilo de *S. nigra*

Neste caso testou-se a seguinte hipótese nula - H_0 = que existe um bom ajustamento ao modelo de distribuição Pearson χ^2 (isto é: verifica-se igualdade de ajustamento). O nível de significância selecionado para rejeitar a H_0 foi de 95%.

Teste do Qui-Quadrado				
		(χ^2)	df ^b	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	0,222	2	0,895 ^a

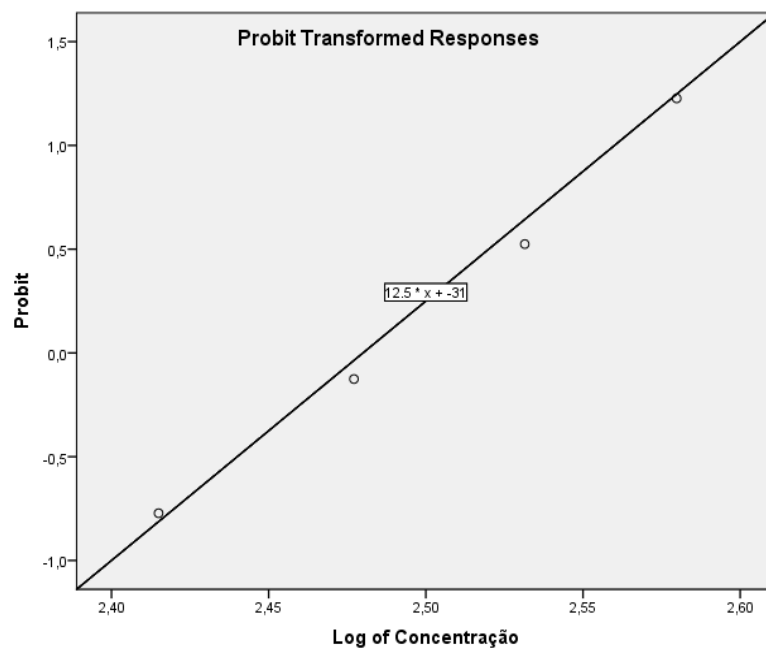
A. Since the significance level is greater than ,150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

b. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

Atividade larvícida com extrato de acetato de etilo de *S. nigra*, com a % das mortalidades observadas e esperadas, 24 horas após o contato.

	Concentração	Total de insetos	Mortalidades Observadas (%)	Mortalidades esperadas (%)	ER	Prob.
Probit	1	2,415	15	14,552	0,668	,146
	2	2,477	40	40,809	-0,589	,408
	3	2,531	67	68,711	-1,321	,687
	4	2,580	88	87,027	1,013	,870

*Média de ensaios com 200 insetos por concentração - % das Mortalidades;
Grupo controlo-mortalidade 0. ER - Erro residual; Prob. - Probabilidade.



FiguraVII.1 - Reta de regressão do Probit da mortalidade (%) das larvas de *Ae. aegypti* em função do logaritmo da concentração (mgL^{-1}) do extrato EtOAc às 24 horas, revelando uma população suscetível.

VII.2 - Limites de confiança de 95 % das doses de *S. nigra* EtOAc e dos seus logaritmos. (a. Fator de heterogeneidade. b. Logaritmo base=10)

Probability	95% Confidence Limits for ul_ <i>S nigra</i>			95% Confidence Limits for log(ul <i>S. nigra</i>)a			
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
CL ₅₀	,010	208,486	189,103	223,235	2,319	2,277	2,349
	,020	218,601	200,321	232,451	2,340	2,302	2,366
	,030	225,272	207,769	238,508	2,353	2,318	2,378
	,040	230,424	213,546	243,178	2,363	2,329	2,386
	,050	234,701	218,357	247,051	2,371	2,339	2,393
	,060	238,404	222,531	250,403	2,377	2,347	2,399
	,070	241,700	226,252	253,384	2,383	2,355	2,404
	,080	244,689	229,632	256,089	2,389	2,361	2,408
	,090	247,439	232,746	258,578	2,393	2,367	2,413
	,100	249,998	235,646	260,894	2,398	2,372	2,416
	,150	260,879	247,990	270,766	2,416	2,394	2,433
	,200	269,863	258,176	278,967	2,431	2,412	2,446
	,250	277,816	267,158	286,298	2,444	2,427	2,457
	,300	285,159	275,386	293,155	2,455	2,440	2,467
	,350	292,136	283,116	299,783	2,466	2,452	2,477
	,400	298,914	290,507	306,364	2,476	2,463	2,486
	,450	305,621	297,671	313,048	2,485	2,474	2,496
	,500	312,369	304,696	319,976	2,495	2,484	2,505
	,550	319,266	311,669	327,285	2,504	2,494	2,515
	,600	326,431	318,690	335,123	2,514	2,503	2,525
CL ₉₀	,650	334,004	325,885	343,661	2,524	2,513	2,536
	,700	342,176	333,425	353,126	2,534	2,523	2,548
	,750	351,220	341,554	363,849	2,546	2,533	2,561
	,800	361,571	350,649	376,378	2,558	2,545	2,576
	,850	374,023	361,371	391,730	2,573	2,558	2,593
	,900	390,301	375,130	412,155	2,591	2,574	2,615
	,910	394,338	378,506	417,273	2,596	2,578	2,620
	,920	398,770	382,201	422,914	2,601	2,582	2,626
	,930	403,702	386,296	429,215	2,606	2,587	2,633
	,940	409,282	390,910	436,375	2,612	2,592	2,640
CL ₉₉	,950	415,740	396,229	444,700	2,619	2,598	2,648
	,960	423,457	402,556	454,699	2,627	2,605	2,658
	,970	433,142	410,455	467,322	2,637	2,613	2,670
	,980	446,360	421,170	484,675	2,650	2,624	2,685
	,990	468,016	438,580	513,401	2,670	2,642	2,710

a. Logarithm base = 10.

VII.3 Resultado da análise de Pearson ao modelo “probit” aplicado ao bioensaio com *Foeniculum vulgare* de Cabo Verde

Teste Pearson Qui-Quadrado				
		χ^2	df ^b	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	0,535	2	0,765 ^a

Tabela dos limites de confiança

Tabela dos limites de confiança							
Probability	95% Confidence Limits for Conc			95% Confidence Limits for log(Conc) ^a			
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
CL ₅₀	,010	14,645	12,824	16,003	1,166	1,108	1,204
	,020	15,465	13,729	16,751	1,189	1,138	1,224
	,030	16,009	14,335	17,244	1,204	1,156	1,237
	,040	16,430	14,808	17,626	1,216	1,170	1,246
	,050	16,781	15,203	17,943	1,225	1,182	1,254
	,060	17,086	15,548	18,218	1,233	1,192	1,260
	,070	17,358	15,856	18,463	1,240	1,200	1,266
	,080	17,605	16,137	18,685	1,246	1,208	1,271
	,090	17,833	16,396	18,890	1,251	1,215	1,276
	,100	18,045	16,638	19,082	1,256	1,221	1,281
	,150	18,951	17,675	19,899	1,278	1,247	1,299
	,200	19,703	18,538	20,580	1,295	1,268	1,313
	,250	20,372	19,304	21,192	1,309	1,286	1,326
	,300	20,992	20,010	21,766	1,322	1,301	1,338
	,350	21,584	20,678	22,323	1,334	1,316	1,349
	,400	22,160	21,320	22,878	1,346	1,329	1,359
	,450	22,733	21,944	23,444	1,357	1,341	1,370
	,500	23,311	22,559	24,034	1,368	1,353	1,381
	,550	23,904	23,169	24,662	1,378	1,365	1,392
	CL ₉₀	,600	24,522	23,784	25,340	1,390	1,376
,650		25,177	24,412	26,087	1,401	1,388	1,416
,700		25,886	25,069	26,922	1,413	1,399	1,430
,750		26,674	25,775	27,879	1,426	1,411	1,445
,800		27,580	26,563	29,007	1,441	1,424	1,462
,850		28,675	27,492	30,402	1,458	1,439	1,483
,900		30,114	28,685	32,278	1,479	1,458	1,509
,910		30,473	28,979	32,751	1,484	1,462	1,515
,920		30,867	29,300	33,274	1,489	1,467	1,522
,930		31,306	29,656	33,860	1,496	1,472	1,530
CL ₉₉	,940	31,804	30,057	34,528	1,502	1,478	1,538
	,950	32,382	30,521	35,307	1,510	1,485	1,548
	,960	33,074	31,073	36,246	1,519	1,492	1,559
	,970	33,945	31,764	37,438	1,531	1,502	1,573
	,980	35,138	32,703	39,087	1,546	1,515	1,592
	,990	37,105	34,234	41,840	1,569	1,534	1,622

a. Logarithm base = 10.

VII.4 Resultado da análise de Pearson ao modelo “probit” aplicado ao bioensaio com *Foeniculum vulgare* de Portugal

Teste Pearson Qui-Quadrado				
		χ^2	df ^b	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	1,825	3	0,609 ^a

Tabela dos limites de confiança

Tabela dos limites de confiança							
Probability	95% Confidence Limits for Conc			95% Confidence Limits for log(Conc) ^a			
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	
LC ₅₀	,010	15,188	13,612	16,514	1,181	1,134	1,218
	,020	16,330	14,802	17,611	1,213	1,170	1,246
	,030	17,098	15,609	18,346	1,233	1,193	1,264
	,040	17,700	16,243	18,920	1,248	1,211	1,277
	,050	18,206	16,777	19,402	1,260	1,225	1,288
	,060	18,647	17,245	19,823	1,271	1,237	1,297
	,070	19,043	17,665	20,200	1,280	1,247	1,305
	,080	19,405	18,049	20,545	1,288	1,256	1,313
	,090	19,739	18,404	20,864	1,295	1,265	1,319
	,100	20,053	18,737	21,163	1,302	1,273	1,326
	,150	21,403	20,174	22,456	1,330	1,305	1,351
	,200	22,542	21,381	23,554	1,353	1,330	1,372
	,250	23,566	22,462	24,552	1,372	1,351	1,390
	,300	24,526	23,465	25,499	1,390	1,370	1,407
	,350	25,450	24,420	26,425	1,406	1,388	1,422
	,400	26,359	25,347	27,352	1,421	1,404	1,437
	,450	27,270	26,259	28,297	1,436	1,419	1,452
	,500	28,197	27,172	29,279	1,450	1,434	1,467
	,550	29,155	28,099	30,314	1,465	1,449	1,482
	LC ₉₀	,600	30,162	29,054	31,423	1,479	1,463
,650		31,240	30,057	32,632	1,495	1,478	1,514
,700		32,417	31,134	33,977	1,511	1,493	1,531
,750		33,737	32,321	35,509	1,528	1,509	1,550
,800		35,271	33,678	37,318	1,547	1,527	1,572
,850		37,146	35,312	39,564	1,570	1,548	1,597
,900		39,649	37,459	42,610	1,598	1,574	1,630
,910		40,278	37,993	43,383	1,605	1,580	1,637
,920		40,973	38,582	44,241	1,612	1,586	1,646
,930		41,751	39,238	45,205	1,621	1,594	1,655
LC ₉₉	,940	42,637	39,982	46,308	1,630	1,602	1,666
	,950	43,671	40,847	47,601	1,640	1,611	1,678
	,960	44,918	41,885	49,169	1,652	1,622	1,692
	,970	46,499	43,195	51,171	1,667	1,635	1,709
	,980	48,688	44,995	53,963	1,687	1,653	1,732
	,990	52,350	47,978	58,687	1,719	1,681	1,769

a. Logarithm base = 10.

VII.5 Resultado da análise de Pearson ao modelo “probit” aplicado ao bioensaio com *Mentha pulegium* de Cabo Verde

Teste Pearson Qui-Quadrado				
		χ^2	df ^b	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	1,734	4	0,785 ^a

Tabela dos limites de confiança

Probability		95% Confidence Limits for Con			95% Confidence Limits for log(Con) ^a		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
LC₅₀	,010	79,213	71,861	85,394	1,899	1,856	1,931
	,020	84,401	77,298	90,343	1,926	1,888	1,956
	,030	87,866	80,953	93,638	1,944	1,908	1,971
	,040	90,567	83,813	96,199	1,957	1,923	1,983
	,050	92,825	86,211	98,337	1,968	1,936	1,993
	,060	94,791	88,303	100,196	1,977	1,946	2,001
	,070	96,549	90,178	101,858	1,985	1,955	2,008
	,080	98,151	91,888	103,372	1,992	1,963	2,014
	,090	99,631	93,470	104,769	1,998	1,971	2,020
	,100	101,013	94,949	106,074	2,004	1,977	2,026
	,150	106,942	101,303	111,675	2,029	2,006	2,048
	,200	111,901	106,623	116,373	2,049	2,028	2,066
	,250	116,338	111,376	120,596	2,066	2,047	2,081
	,300	120,473	115,788	124,558	2,081	2,064	2,095
	,350	124,435	119,990	128,391	2,095	2,079	2,109
	,400	128,316	124,071	132,187	2,108	2,094	2,121
	,450	132,185	128,095	136,026	2,121	2,108	2,134
	,500	136,107	132,118	139,982	2,134	2,121	2,146
	,550	140,146	136,194	144,132	2,147	2,134	2,159
	,600	144,372	140,380	148,562	2,159	2,147	2,172
LC₉₀	,650	148,874	144,751	153,381	2,173	2,161	2,186
	,700	153,771	149,408	158,731	2,187	2,174	2,201
	,750	159,236	154,502	164,822	2,202	2,189	2,217
	,800	165,550	160,273	171,992	2,219	2,205	2,236
	,850	173,227	167,162	180,864	2,239	2,223	2,257
	,900	183,394	176,125	192,820	2,263	2,246	2,285
	,910	185,938	178,344	195,843	2,269	2,251	2,292
	,920	188,742	180,781	199,186	2,276	2,257	2,299
	,930	191,873	183,493	202,935	2,283	2,264	2,307
	,940	195,432	186,562	207,214	2,291	2,271	2,316
LC₉₉	,950	199,572	190,117	212,214	2,300	2,279	2,327
	,960	204,547	194,371	218,254	2,311	2,289	2,339
	,970	210,834	199,717	225,929	2,324	2,300	2,354
	,980	219,492	207,033	236,574	2,341	2,316	2,374
	,990	233,865	219,077	254,422	2,369	2,341	2,406

VII.6 Resultado da análise de Pearson ao modelo “probit” aplicado ao bioensaio com *Mentha pulegium* de Portugal

Teste Pearson Qui-Quadrado				
		χ^2	df ^b	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	28,146	4	0,000 ^a

Tabela dos limites de cconfiança

Probability	95% Confidence Limits for Conc			95% Confidence Limits for log(Conc) ^b		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
,010	54,947	27,045	70,381	1,740	1,432	1,847
,020	59,426	31,615	74,357	1,774	1,500	1,871
,030	62,456	34,893	77,027	1,796	1,543	1,887
,040	64,836	37,571	79,120	1,812	1,575	1,898
,050	66,839	39,892	80,880	1,825	1,601	1,908
,060	68,593	41,973	82,423	1,836	1,623	1,916
,070	70,168	43,881	83,813	1,846	1,642	1,923
,080	71,609	45,656	85,088	1,855	1,659	1,930
,090	72,946	47,327	86,275	1,863	1,675	1,936
,100	74,198	48,913	87,393	1,870	1,689	1,941
,150	79,616	55,986	92,311	1,901	1,748	1,965
,200	84,202	62,187	96,637	1,925	1,794	1,985
,250	88,346	67,890	100,751	1,946	1,832	2,003
,300	92,242	73,263	104,868	1,965	1,865	2,021
,350	96,005	78,388	109,156	1,982	1,894	2,038
,400	99,718	83,304	113,766	1,999	1,921	2,056
,450	103,446	88,027	118,851	2,015	1,945	2,075
LC₅₀	,500	107,252	124,572	2,030	1,966	2,095
,550	111,197	96,946	131,102	2,046	1,987	2,118
,600	115,355	101,204	138,637	2,062	2,005	2,142
,650	119,816	105,408	147,429	2,079	2,023	2,169
,700	124,704	109,656	157,832	2,096	2,040	2,198
,750	130,203	114,085	170,402	2,115	2,057	2,231
,800	136,612	118,896	186,097	2,135	2,075	2,270
,850	144,482	124,430	206,773	2,160	2,095	2,315
LC₉₀	,900	155,031	236,735	2,190	2,119	2,374
,910	157,692	133,094	244,683	2,198	2,124	2,389
,920	160,635	134,945	253,650	2,206	2,130	2,404
,930	163,934	136,992	263,923	2,215	2,137	2,421
,940	167,699	139,295	275,929	2,225	2,144	2,441
,950	172,099	141,946	290,337	2,236	2,152	2,463
,960	177,416	145,098	308,288	2,249	2,162	2,489
,970	184,178	149,033	331,963	2,265	2,173	2,521
,980	193,568	154,376	366,400	2,287	2,189	2,564
LC₉₉	,990	209,348	428,337	2,321	2,212	2,632

a. A heterogeneity factor is used. b. Logarithm base = 10.